



Tesis doctoral 2013

Cultivo, biología reproductiva y bioquímica de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* en la Ría de Arousa



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento de Bioloxía Celular e Molecular

Ícaro Gomes Antonio





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento de Biología Celular y Molecular

Tesis Doctoral

Cultivo, Biología reproductiva y Bioquímica de la Ostra japonesa
Crassostrea gigas en la Ría de Arousa

Ícaro Gomes Antonio

2013

Director:

Dr. Alejandro Pérez Camacho

Esta tesis se ha realizado en el Centro Oceanográfico de A Coruña del Instituto Español de Oceanografía y en la Universidade da Coruña. Durante el periodo de realización de la misma, he disfrutado de una beca de Formación Predoctoral otorgada por el Gobierno de España, a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación.



Instituto Español de Oceanografía
Centro Oceanográfico de A Coruña



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ALEJANDRO PÉREZ CAMACHO, Doctor en Biología, Coordinador de Proyectos del Instituto Español de Oceanografía,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **Cultivo, Biología reproductiva y Bioquímica de la Ostra japonesa *Crassostrea gigas* en la Ría de Arousa**, que presenta ÍCARO GOMES ANTONIO para optar al grado de Doctor por la Universidade da Coruña, ha sido realizado bajo mi dirección y, considerando su conclusión, autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente, con el visto bueno del tutor, Dr. Eduardo González Gurriarán, Catedrático de Zoología de la Universidade da Coruña.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, se firma el presente certificado en A Coruña, Agosto de 2013.

Director

Fdo. Dr. Alejandro Pérez Camacho

Tutor

Fdo. Dr. Eduardo González Gurriarán

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que han contribuido de una u otra manera para la consecución de esta Tesis:

Primeramente, me gustaría agradecer a mi director de tesis, Alejandro Pérez Camacho, por haber creído en mí y haberme dado la oportunidad de venir a España y trabajar con él y su equipo. Su orientación e ideas, durante el periodo de construcción de la tesis han sido de gran importancia para la conclusión de la misma.

A mi tutor, Eduardo González Gurríaran, por haberme recibido tan cordialmente, hablando siempre en gallego, para que yo me acostumbrará poco a poco al castellano. Además de las excelentes sugerencias que ayudaron a mejorar la tesis.

A Joaquín Espinosa por su desinteresada ayuda durante los análisis histológicos.

A Luis Fernandes, Inma, Patricia y Nacho, por haberme enseñado los procesamientos bioquímicos y tenido paciencia conmigo durante el tiempo que estuve en su laboratorio.

A mis amigos del grupo de moluscos del IEO María Blanco, Carlota, Paula Mallo y Pepe Escourido, por todos los momentos que pasamos juntos sea en los trabajos en la batea, durante los procesamientos en el laboratorio o durante las simples charlas durante el café en el Oceanográfico.

A mis compañeros del Centro Oceanográfico de A Coruña, Pablo, Marcos, Paula Iglesias, Gelines, Guillermo, Miguel, Isabel, Bego, Joaquín, Lucía, Luz, Fernando, María, ... que han ayudado a pasar un tiempo lejos del ordenador durante los cafecillos o las cenas.

A la beca de la AECID-MAEC que he disfrutado durante la elaboración de esta tesis.

A mi familia que siempre me ha apoyado en todas mis decisiones durante mi vida.

A mi mujer Marina por estar a mi lado construyendo lo más importante que tenemos, que es nuestra familia.

Muchas gracias a todos.

Muito obrigado.

RESUMEN

En Galicia, el cultivo de ostras estaba basado en la ostra plana *Ostrea edulis*, pero, debido a la sobrepesca y la incidencia de parásitos el cultivo de ésta especie se volvió inviable. Con vistas a mantener la ostricultura gallega, se permitió la importación de la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, creando la necesidad de estudios más detallados acerca de la biología reproductiva y del ciclo de cultivo de esta especie bajo las características ambientales de las zonas de producción gallegas. La presente tesis evalúa y determina el ciclo reproductivo y el ciclo de almacenamiento y movilización de las reservas de la ostra japonesa cultivada en batea en la Ría de Arousa. Además, evalúa el efecto de los sistemas de cultivo de jaulas y cuerdas en el crecimiento, reproducción y bioquímica de la ostra japonesa y el efecto de diferentes densidades de cultivo en jaulas sobre el crecimiento y supervivencia. Los resultados más destacables de la presente tesis son que las ostras cultivadas en la Ría de Arousa siempre están en proceso de gametogénesis no entrando en el periodo de reposo y que la temperatura necesaria para la inducción a la puesta es distinta entre los sexos. En relación al cultivo, el sistema afecta directamente a la acumulación de las reservas y a la producción de gametos, con una superioridad de las cuerdas. El sistema de jaulas presenta un efecto de auto-raleo, lo que por otra parte no es observado en el sistema de cuerdas.

RESUMO

En Galicia, o cultivo da ostra baseouse na ostra plana *Ostrea edulis*, pero debido a sobrepesca e a incidencia de parasitos o cultivo desta especie se fixo inviábel. Co fin de manter a ostricultura galega, se permitiu a importación da ostra xaponesa *Crassostrea gigas*, creando a necesidade de estudos máis detallados da bioloxía reprodutiva e do ciclo de cultivo desta especie para as características ambientais das zonas de produción de Galicia. Esta tese avalía e determina o ciclo reprodutivo e o ciclo de almacenamento e mobilización das reservas da ostra xaponesa cultivada na Ría de Arosa. Tamén avalía o efecto dos sistemas de cultivo en gaiolas e cordas no crecemento, reprodución e bioquímica da ostra xaponesa e o efecto de distintas densidades de cultivo en gaiola sobre o crecemento e supervivencia. Os principais resultados desta tese é que as ostras cultivadas na Ría de Arosa están sempre en proceso de gametogenese non entrando no período de descanso e a temperatura necesaria para a indución da desova é diferente entre os sexos. En relación ao cultivo, o sistema afecta directamente a acumulación de reservas e a produción de gametos, cunha superioridade das cordas. O sistema de gaiola ten un efecto de auto-dilución, o que non é observado no sistema de cordas.

ABSTRACT

In Galicia, oyster farming was based on the flat oyster *Ostrea edulis*, but due to overfishing and the incidence of parasites, the culture of this species became unviable. In order to maintain the Galician oyster culture, was allowed the introduction of *Crassostrea gigas*, creating the need for more studies on the reproductive biology and culture cycle of this species under the environmental characteristics of the Galician production areas. This thesis evaluates and determines the reproductive cycle and the reserves storage and mobilization cycle of the Japanese oyster grown in a raft in the Ria de Arousa. In addition, evaluates the effect of the culture gears of cages and ropes in growth, reproduction, and biochemistry of the Japanese oyster and the effect of different stocking densities in cages on growth and survival. The highlights of this thesis are that oysters grown in the Ria de Arosa are always in the gametogenesis process not entering in the rest period and the temperature required for spawning induction is different between sexes. In relation to culture, the gear directly affects the reserve accumulation and the production of gametes, with a superiority of the ropes. The cage gear has a self-thinning effect, which otherwise is not observed in the ropes.

ÍNDICE

TÍTULO: CULTIVO, BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y BIOQUÍMICA DE LA OSTRA JAPONESA *Crassostrea gigas* EN LA RÍA DE AROUSA

CAPÍTULOS

1.	PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	1
2.	INTRODUCCIÓN GENERAL	5
	2.1. Características biológicas de <i>Crassostrea gigas</i>	5
	2.1.1. <i>Sistemática</i>	5
	2.1.2. <i>Anatomía</i>	5
	2.1.3. <i>Área de distribución y hábitat</i>	8
	2.1.4. <i>Ciclo de vida</i>	8
	2.2. Reproducción en ostras	9
	2.2.1. <i>Diferenciación de las células germinales</i>	9
	2.2.2. <i>Gametogénesis</i>	10
	2.2.3. <i>Ciclo reproductivo</i>	11
	2.2.4. <i>Factores que regulan el ciclo reproductivo</i>	15
	2.3. Almacenamiento y movilización de reservas energéticas en ostras	19
	2.3.1. <i>Tejido de reserva</i>	20
	2.3.2. <i>Variación estacional de los componentes bioquímicos</i>	20
	2.4. Cultivo de ostras	22
	2.4.1. <i>Cultivo de ostras en el mundo</i>	22
	2.4.2. <i>Cultivo de ostras en España</i>	23
	2.4.3. <i>Factores que afectan al cultivo de ostras</i>	24
3.	BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA OSTRA JAPONESA <i>Crassostrea gigas</i> EN LA RÍA DE AROUSA	27
	3.1. Introducción	27
	3.2. Material y métodos	30
	3.2.1. <i>Área de estudio y muestreo</i>	30
	3.2.2. <i>Índice de Condición</i>	30
	3.2.3. <i>Análisis histológico</i>	30
	3.2.4. <i>Análisis de imagen</i>	33
	3.2.5. <i>Variables ambientales</i>	34

3.2.6.	<i>Presentación de los datos y análisis estadístico</i>	34
3.3.	Resultados	35
3.3.1.	<i>Proporción sexual</i>	35
3.3.2.	<i>Índice de Condición (IC)</i>	35
3.3.3.	<i>Índice de Ocupación gonadal (IOG)</i>	37
3.3.4.	<i>Talla media de los ovocitos</i>	38
3.3.5.	<i>Estadios de desarrollo gonadal</i>	39
3.3.5.1.	<i>Machos</i>	39
3.3.5.2.	<i>Hembras</i>	41
3.3.6.	<i>Variables ambientales</i>	43
3.3.7.	<i>Relación entre los factores ambientales y el IOG e IC</i>	44
3.4.	Discusión	46
3.5.	Conclusiones	51
4.	EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA GENERAL DE <i>Crassostrea gigas</i> EN RELACIÓN AL CICLO REPRODUCTIVO EN LA RÍA DE AROUSA	55
4.1.	Introducción	55
4.2.	Material y métodos	57
4.2.1.	<i>Área de estudio y muestreo</i>	57
4.2.2.	<i>Composición bioquímica general</i>	57
4.2.2.1.	<i>Proteínas</i>	57
4.2.2.2.	<i>Carbohidratos totales</i>	58
4.2.2.3.	<i>Glucógeno</i>	58
4.2.2.4.	<i>Lípidos totales</i>	59
4.2.3.	<i>Variables ambientales</i>	59
4.2.4.	<i>Presentación de los datos y análisis estadístico</i>	60
4.3.	Resultados	61
4.3.1.	<i>Resumen del ciclo reproductivo</i>	61
4.3.2.	<i>Medidas biométricas</i>	64
4.3.3.	<i>Composición bioquímica</i>	65
4.3.3.1.	<i>Composición bioquímica general</i>	65
4.3.3.2.	<i>Diferenciación sexual</i>	68
4.3.3.2.1.	<i>Contenido en materia orgánica</i>	68
4.3.3.2.2.	<i>Proteínas</i>	71
4.3.3.2.3.	<i>Carbohidratos</i>	72
4.3.3.2.4.	<i>Glucógeno</i>	73
4.3.3.2.5.	<i>Lípidos</i>	75
4.3.4.	<i>Variables ambientales</i>	76

4.4. Discusión.....	78
4.5. Conclusiones.....	82
5. EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Crassostrea gigas</i> EN LA RÍA DE AROUSA.....	85
5.1. Introducción.....	85
5.2. Material y métodos.....	87
5.2.1. Área de estudio y muestreo.....	87
5.2.2. Índice de Condición.....	87
5.2.3. Análisis histológico.....	88
5.2.4. Análisis de imagen.....	91
5.2.5. Variables ambientales.....	91
5.2.6. Presentación de los datos y análisis estadístico.....	92
5.3. Resultados.....	93
5.3.1. Proporción sexual (sex-ratio).....	93
5.3.2. Índice de Condición (IC).....	94
5.3.3. Índice de Ocupación gonadal (IOG).....	96
5.3.4. Estadios de desarrollo gonadal.....	98
5.3.4.1. Sistema de Jaulas.....	98
5.3.4.2. Sistema de Cuerdas.....	100
5.3.5. Variables ambientales.....	101
5.3.6. Relación entre los factores ambientales y el IOG e IC.....	102
5.4. Discusión.....	104
5.5. Conclusiones.....	109
6. EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA GENERAL DE <i>Crassostrea gigas</i> EN RELACIÓN AL CICLO REPRODUCTIVO.....	113
6.1. Introducción.....	113
6.2. Material y métodos.....	115
6.2.1. Área de estudio y muestreo.....	115
6.2.2. Composición bioquímica general.....	115
6.2.2.1. Proteínas.....	116
6.2.2.2. Carbohidratos totales.....	116
6.2.2.3. Glucógeno.....	116
6.2.2.4. Lípidos totales.....	117
6.2.3. Variables ambientales.....	118
6.2.4. Presentación de los datos y análisis estadístico.....	118

6.3. Resultados	120
6.3.1. <i>Resumen del ciclo reproductivo</i>	120
6.3.2. <i>Medidas biométricas</i>	123
6.3.2.1. <i>Jaulas</i>	123
6.3.2.2. <i>Cuerdas</i>	125
6.3.3. <i>Composición bioquímica</i>	126
6.3.3.1. <i>Jaulas</i>	126
6.3.3.2. <i>Cuerdas</i>	128
6.3.4. <i>Comparación entre sistemas de cultivo</i>	131
6.3.4.1. <i>Contenido en materia orgánica</i>	131
6.3.4.2. <i>Proteínas</i>	132
6.3.4.3. <i>Carbohidratos</i>	133
6.3.4.4. <i>Glucógeno</i>	134
6.3.4.5. <i>Lípidos</i>	136
6.3.5. <i>Variables ambientales</i>	137
6.4. Discusión	139
6.5. Conclusiones	143
7. EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE	
<i>Crassostrea gigas</i> CULTIVADA EN BATEA	147
7.1. Introducción	147
7.2. Material y métodos	149
7.2.1. <i>Área de cultivo y muestreo</i>	149
7.2.2. <i>Peso húmedo y peso seco de las partes blandas</i>	150
7.2.3. <i>Presencia de cámaras de gel</i>	150
7.2.4. <i>Índices de forma (IF)</i>	150
7.2.5. <i>Variables ambientales</i>	150
7.2.6. <i>Análisis estadístico</i>	151
7.3. Resultados	152
7.3.1. <i>Crecimiento en longitud y anchura</i>	152
7.3.2. <i>Índices de forma (IF)</i>	154
7.3.3. <i>Peso total, Peso húmedo y peso seco de las partes blandas</i>	155
7.3.4. <i>Supervivencia</i>	158
7.3.5. <i>Producción por unidad de cultivo</i>	158
7.3.6. <i>Presencia de cámaras de gel</i>	159
7.3.7. <i>Variables ambientales</i>	160
7.4. Discusión	162
7.5. Conclusiones	165

8.	EFECTO DE LA DENSIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA OSTR	
	<i>Crassostrea gigas</i> CULTIVADA EN BATEA.....	169
	8.1. Introducción.....	169
	8.2. Material y métodos.....	171
	8.2.1. <i>Área de cultivo y muestreo.....</i>	171
	8.2.2. <i>Peso húmedo y peso seco de las partes blandas.....</i>	172
	8.2.3. <i>Presencia de cámaras de gel.....</i>	172
	8.2.4. <i>Índices de forma (IF).....</i>	172
	8.2.5. <i>Variables ambientales.....</i>	173
	8.2.6. <i>Análisis estadístico.....</i>	173
	8.3. Resultados.....	174
	8.3.1. <i>Crecimiento en longitud y anchura.....</i>	174
	8.3.2. <i>Índices de forma (IF).....</i>	176
	8.3.3. <i>Peso total.....</i>	178
	8.3.4. <i>Supervivencia.....</i>	180
	8.3.5. <i>Producción por unidad de cultivo.....</i>	181
	8.3.6. <i>Peso húmedo y peso seco de las partes blandas.....</i>	182
	8.3.7. <i>Presencia de cámaras de gel.....</i>	184
	8.3.8. <i>Variables ambientales.....</i>	186
	8.4. Discusión.....	187
	8.5. Conclusiones.....	191
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	195
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201

1. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

El cultivo de moluscos es un área dentro de la acuicultura mundial que representa el 23,6% de la producción del sector, con 14,2 millones de toneladas en el año de 2010 (FAO, 2012). España es el principal productor de moluscos en Europa con una producción de aproximadamente 193 mil toneladas en el año de 2010 (FAO, 2013a).

En Galicia, la ostra plana, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), fue durante muchos años el principal molusco recolectado, pero, debido a una sobreexplotación entre los años de 1950 y 1960, los bancos naturales de las rías de Vigo, Arousa y Muros prácticamente desaparecieron. Paralelamente, comenzó el desarrollo de su cultivo, siendo instaladas más de 300 bateas en las Rías gallegas, con una producción aproximada de 100 millones de ostras. Este cultivo se realizaba partiendo de ostras jóvenes, importadas de Francia e Italia (Iglesias *et al.*, 2005).

El desarrollo de este cultivo se vio frenado al detectarse una elevada mortandad en las ostras importadas, debido primero al protozooario *Marteilia refringens* y, posteriormente, a una segunda infección provocada por *Bonamia ostreae*, que se extendió en las diferentes zonas de suministro, hasta hacer inviable el cultivo de esta especie (Montes *et al.*, 1990). Con vistas a mantener la ostricultura gallega, se permitió la importación de la ostra *C. gigas* en carácter experimental, con el fin de valorar la viabilidad de esta especie desde un punto de vista productivo y ecológico (Xunta de Galicia, 1992).

La introducción en Galicia de la ostra japonesa *C. gigas* en 1991 supuso un gran avance en el sector ostrícola, por su mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *O. edulis*, de cultivo tradicional y autóctona de esta zona. Esta situación, como toda introducción de una especie foránea, crea una gran necesidad de estudios más detallados acerca de la biología reproductiva y del ciclo de cultivo de *C. gigas*, bajo las características ambientales en las costas españolas, con especial énfasis en las zonas de producción gallegas.

El *objetivo principal* de la presente tesis es profundizar en el conocimiento científico de la biología de la ostra japonesa *C. gigas* en Galicia, principalmente en lo que se refiere a las características reproductivas, bioquímicas y de cultivo, contribuyendo en el desarrollo de los sistemas de producción de esta especie en España. Planteándose como objetivos específicos los siguientes.

Estudiar la biología reproductiva de la ostra japonesa *C. gigas* cultivada en batea en la Ría de Arousa (capítulo 3). En concreto, se intenta determinar el patrón del ciclo reproductivo y evaluar las influencias de los factores ambientales sobre el desarrollo gonadal, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo.

El capítulo 4 está dirigido a la evaluación de la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas durante dos ciclos reproductivos consecutivos de la ostra japonesa

cultivada en batea, además de evaluar la influencia de la diferenciación sexual en la composición bioquímica general (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos).

Estudiar la influencia que el sistema de cultivo ejerce sobre la biología reproductiva, es el objetivo planteado en el capítulo 5. También se estudian las posibles implicaciones que el sistema de cultivo pueda tener sobre la determinación sexual.

El capítulo 6 evalúa el efecto del sistema de cultivo sobre el almacenamiento y utilización de las reservas bioquímicas, correlacionando con el ciclo reproductivo.

En el capítulo 7, hemos pretendido analizar el efecto de los sistemas de cultivo en jaulas y cuerdas en el crecimiento, tiempo de cultivo y supervivencia de *C. gigas* cultivada en batea en la Ría de Arousa, con el intuito de determinar el mejor sistema de cultivo con relación a la cantidad y calidad producida

En el último apartado (capítulo 8) se ha hecho un análisis de la idoneidad para el cultivo de ostra en las jaulas de cultivo patentadas por el IEO, evaluando el efecto de diferentes densidades de cultivo en el crecimiento, tiempo de cultivo y supervivencia de la ostra japonesa.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Crassostrea gigas*

2.1.1. Sistemática

1. Phylum	Mollusca
2. Clase	Bivalvia
3. Subclase	Pteriomorphia
4. Orden	Ostreoida
5. Superfamilia	Ostreoidea
6. Familia	Ostreidae
7. Género	<i>Crassostrea</i>
8. Especie	<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)
9. Nombre común	Ostra japonesa, Ostra rizada

2.1.2. Anatomía

Las ostras son organismos sésiles, comprimidos lateralmente y alargados en su parte dorso-ventral (Eble y Scro, 1996). La concha de *C. gigas* está formada por dos valvas asimétricas calcificadas, la que se adhiere al sustrato se considera como izquierda, mientras que la superpuesta es considerada como derecha. Las valvas son formadas por tres partes distintas desde el exterior al interior: el periostraco que es una membrana orgánica delgada y que presenta coloración, las capas prismáticas que son prismas verticales de carbonato de calcio recubiertas por una matriz proteica de conquiolina y la parte interna formada por estructuras laminales compuestas por cristales de aragonito. Ambas valvas están unidas por un músculo aductor y por una charnela, ligamento proteico y ligeramente calcificado que se encuentra sobre la línea media dorsal.

Las partes blandas están cubiertas por el manto. El borde del manto está compuesto por tres pliegues. El pliegue externo secreta las dos capas externas de la concha, mientras la capa interna es secretada por el epitelio externo del manto. El pliegue medio tiene una función sensorial y el pliegue interno es muscular.

El manto está compuesto por tejido conectivo, vasos sanguíneos y nervios, y cual está cubierto en ambos lados por un epitelio unicelular. El manto tiene principalmente funciones sensoriales, mecánicas y de protección y es a través de los tentáculos del manto y el pliegue del velo que las ostras pueden detectar la presencia y características del alimento y direccionarlo a

través del control del flujo de agua (Eble y Scro, 1996). Además, el manto proporciona cierta protección del medio externo y de la depredación (Galtsoff, 1964). En *Crassostrea gigas* se ha demostrado a nivel molecular que el manto tiene otras funciones, como lo son la síntesis de proteínas, transducción de señales, soporte metabólico, formación y calcificación de la concha (Miyamoto *et al.*, 2002).

El espacio libre entre los dos lóbulos del manto se denomina cavidad paleal en donde se aloja la masa visceral. A cada lado de la masa visceral se encuentra un par de branquias lamelares. Las branquias tienen la doble función de encargarse de la alimentación y del intercambio gaseoso en el proceso de respiración. Estructuralmente, las branquias son lamelas compuestas de filamentos branquiales, los cuales a su vez están recubiertos de cilios anteriores y laterales, los cuales permiten la circulación del agua y un aporte continuo de oxígeno y partículas de alimento (Eble y Scro, 1996). Las branquias secretan un mucopolisacárido al que se adhiere a las partículas de alimento, las cuales son dirigidas por los cilios hacia los palpos labiales antes de ser ingeridas (Ward *et al.*, 1994).

La masa visceral contiene los órganos de la digestión, excreción y reproducción. El sistema digestivo está formado por branquias, palpos labiales, boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano (Figura 2.1). En la parte anterior de las branquias, dos pares de palpos labiales permiten la clasificación y orientación de los alimentos hacia la boca. El alimento pasa por un esófago ciliado muy corto hasta llegar al estómago que contiene un estilete cristalino, estructura de textura gelatinosa en donde se encuentran las enzimas digestivas. El intestino recorre un gran número de órganos, partiendo de la proximidad del corazón, para rodear la glándula digestiva hacia el recto y termina en el ano, al lado del músculo aductor. El desplazamiento del alimento se lleva a cabo con la ayuda de cilios que recubren el epitelio interno del intestino (Eble y Scro, 1996).

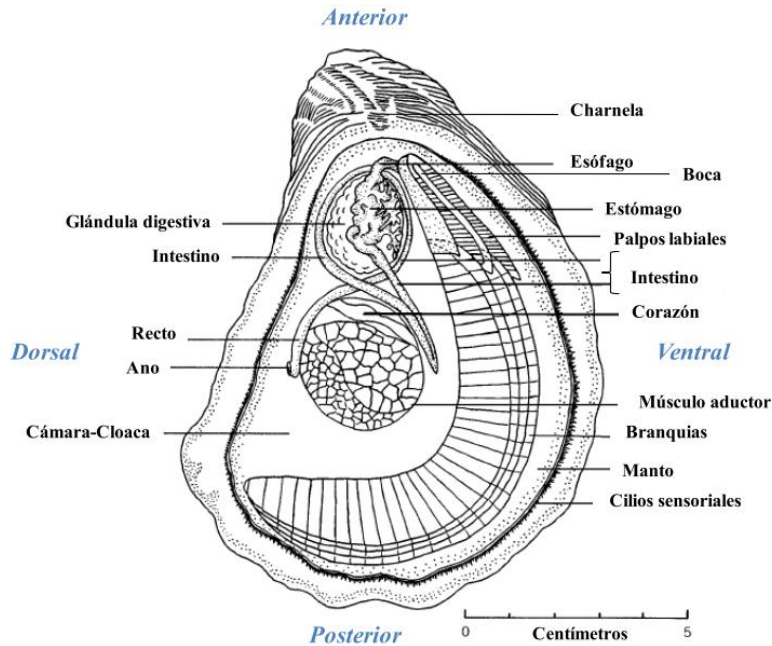


Figura 2.1. Anatomía general interna de la ostra *Crassostrea virginica* (Tomado de Galtsoff, 1964).

El sistema de excreción está constituido por el riñón y la glándula pericardial, los cuales se encuentran de manera ventral al corazón y al músculo aductor.

El sistema circulatorio de las ostras es abierto: la hemolinfa es bombeada por el corazón a través de arterias, las cuales se bifurcan en vasos en el seno de los tejidos irrigados por la hemolinfa. Estructuralmente, el corazón está compuesto de un ventrículo y de dos aurículas. El corazón se encuentra dentro de la cavidad del pericardio, situado entre la masa visceral y el músculo aductor (Eble y Scro, 1996).

El sistema nervioso es reducido, secundariamente descentralizado y está compuesto por ganglios cerebrales, viscerales y motores, organizados en varios pares de nervios (Galtsoff, 1964). El sistema nervioso y la secreción de neurotransmisores/neurohormonas, como la serotonina, controlan los movimientos de las branquias (Carroll y Capatane, 2007), los latidos del corazón (Kuwasawa y Hill, 1997), así como los procesos de maduración de las gónadas y los mecanismos de desove (Siniscalchi *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2006).

El sistema reproductivo situado en la masa visceral, tejido mixto entre la glándula digestiva y el manto, está constituido por las gónadas que se originan a partir de células mesodérmicas situadas en la región posterior del cuerpo. Estas células se multiplican y se separan en dos grupos que se disponen a ambos lados del cuerpo. El tejido conjuntivo, circunda esta estructura formando un sistema de túbulos y folículos. Las gónadas son estructuras difusas que en periodo de reposo sexual desaparecen casi por completo, y cuando alcanzan la madurez sexual, rodean la glándula digestiva y el resto de los órganos, ocupando el espacio libre que queda entre estos, presentando una coloración blanquecina y de aspecto lechoso.

Por último, el músculo aductor que sirve para abrir y cerrar las valvas. El músculo está formado por dos partes, una translúcida responsable por los movimientos de cierre rápido y otra de coloración blanca opaca que permite que las valvas permanezcan cerradas por un largo periodo.

2.1.3. Área de distribución y hábitat

Desde el punto de vista geográfico, *C. gigas* es una especie ampliamente distribuida por el mundo. Originaria de Asia, fue introducida con éxito en muchas regiones (Europa, América, Oceanía). Hoy en día, se puede decir que *C. gigas* puede ser encontrada en todos los continentes.

Es una especie encontrada en aguas costeras y en estuarios hasta la profundidad de 40 metros. Prefiere substratos duros como rocas, conchas y otras estructuras, aunque también se puede encontrar en áreas fangosas o de arena (FAO, 2013b)

El intervalo óptimo de salinidad para la especie es de 20 a 25‰, aunque la especie puede ocurrir en salinidades por debajo de 10‰ y sobrevivir en salinidades superiores a los 35‰. También tiene una amplia tolerancia a la temperatura con un rango de -1,8 a 35 °C (FAO, 2013b).

2.1.4. Ciclo de vida

C. gigas es descrita en la literatura como una especie hermafrodita sucesiva protándrica irregular (Buroker, 1983; Guo *et al.*, 1998), de esta forma, normalmente en su primer ciclo de desarrollo gonadal las ostras maduran como machos, pudiendo cambiar el sexo entre dos estaciones. Guo *et al.* (1998) proponen un modelo de locus simple para explicar la determinación del sexo en *C. gigas*. Este modelo estaría constituido de un alelo macho dominante (M) y un alelo hembra protándrico (F), resultando dos poblaciones de machos: los machos verdaderos (MF) que no cambian de sexo durante toda la vida y los machos cambiantes (FF) que pueden desarrollar el sexo hembra bajo control de genes secundarios o de factores ambientales.

En el medio natural, normalmente, la gametogénesis se desarrolla en un ritmo lento. Al final del invierno, las líneas germinales se desarrollan hasta alcanzar la madurez a principios del verano. Una vez maduros, los genitores eliminan los gametos directamente en el agua, donde tienen lugar una fecundación externa. Después de la fecundación, el huevo se desarrolla gradualmente pasando por los estadios de mórula, blástula, gástrula hasta llegar a la formación de la larva trocófora. Esta larva se desarrolla y pasa a llamarse larva veliger, presentando una concha (prodisoconcha I) y un velo, órgano de nutrición y locomoción. Al final del desarrollo

larvario, la larva veliger presenta la formación del pie y pasa a ser llamada pediveliger. Durante esta etapa, la larva pasa a buscar un substrato para su fijación. La metamorfosis pone fin a la vida planctónica y la ostra pasa a tener una vida bentónica, que persistirá por el resto de la vida del animal.

2.2. REPRODUCCIÓN EN OSTRAS

La reproducción es un fenómeno universal que asegura la sostenibilidad de las especies por medio de la transmisión de la información genética de una generación a la otra. Las ostras se reproducen sexualmente, de esta manera, dos individuos generan descendientes cuyo material genético proviene de una combinación de los padres. De hecho, este material que irá formar el nuevo ser, es originario de la fusión de dos células reproductivas sexuales, las células germinales o gametos. Los mecanismos fundamentales de la reproducción sexual han sido altamente conservados durante la evolución debido a su importancia en la supervivencia de las especies. La reproducción sexual se puede dividir en tres pasos fundamentales: (1) la diferenciación de las células germinales, (2) la gametogénesis y (3) la fertilización.

2.2.1. Diferenciación de las células germinales

Las células germinales constituyen un tipo celular único altamente especializado (para la transmisión de la información genética) y totipotente (un organismo completo puede regenerarse a partir de la información contenida en estas células) (Raz, 2000). Estas células se separan de las células somáticas durante el desarrollo embrionario en forma de células germinales primordiales (PGCs - primordial germ cells) (Wylie, 1999). Las células germinales primordiales originan, por diferenciación, a las células madre germinales (GSCs – germinal stem cells), que dará origen a las gonias (espermatogonias y ovogonias) en una fase juvenil temprana de los individuos (Figura 2.2). A partir de las células madres germinales tendría lugar la renovación anual de la población de células de la línea germinal en cada ciclo reproductor (Fabioux, 2004).

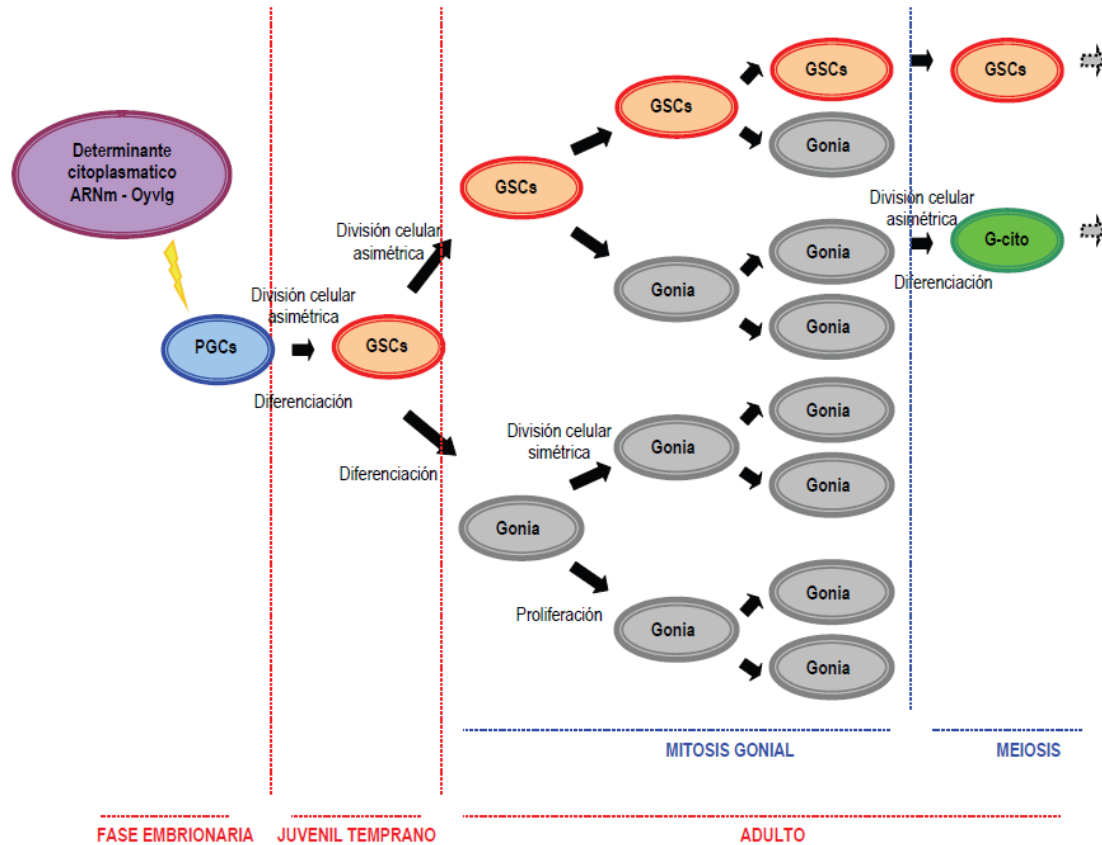


Figura 2.2. Modelo de diferenciación de las células germinales de *Crassostrea gigas* (Fabioux, 2004, Citado en Cadavid, 2008).

2.2.2. Gametogénesis

Gametogénesis es el conjunto de procesos que conducen a la formación de los gametos haploides, los ovocitos y los espermatozoides, a partir de gonias, ovogonias o espermatogonias (diploides). La gametogénesis comprende dos etapas distintas: una etapa de multiplicación mitótica de las gonias y una etapa meiótica (Alberts *et al.*, 1994).

Las primeras células germinales diferenciadas, las gonias (ovogonias o espermatogonias), crecen en el epitelio germinal y se dividen intensamente por mitosis. Estas células presentan un pequeño tamaño ($\approx 6 \mu\text{m}$ de diámetro), un núcleo grande y una fina camada de citoplasma granular (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Las gonias se diferencian en ovocitos o espermatozoides y entran en meiosis. La gametogénesis se produce de una manera centrípeta en los túbulos gonadales, del epitelio germinal a la luz central.

En los machos, los espermatozoides primarios siguen con la meiosis y se diferencian sucesivamente en espermatozoides secundarios, espermátidas y en espermatozoides. El tamaño de las células germinales masculinas disminuye progresivamente durante su diferenciación, el núcleo se condensa y el citoplasma se torna casi inexistente (Kennedy *et al.*, 1996).

En las hembras, las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios, que presentan un núcleo más grande y citoplasma más denso y granular, a medida que avanza la vitelogénesis. Los ovocitos vitelogénicos se desprenden de la pared del folículo y los ovocitos maduros son liberados al lumen del folículo. Los ovocitos liberados durante la puesta se bloquean en la profase I de la meiosis. La emisión en el agua del mar y la fertilización desencadenan sucesivamente la reanudación de la meiosis y la ruptura de la vesícula germinal y la expulsión del primer cuerpo polar.

2.2.3. Ciclo reproductivo

En general, el ciclo reproductivo en ostras consta de una serie de fases consecutivas, acumulación de reservas en la gónada u órganos almacén, desarrollo de la gónada, gametogénesis, maduración de gametos, puesta y periodo de reposo (Giese, 1959; Bayne, 1976). La sucesión de estos fenómenos puede ser sincrónica o asincrónica dentro de la población (Sastry, 1979), y la duración y el número de ciclos gametogénicos puede variar en poblaciones de la misma especie, dependiendo de la zona geográfica y de las condiciones ambientales (Giese y Kanatani, 1987).

El estudio del ciclo reproductivo de *C.gigas* cultivada en ambiente natural ya ha sido reportado por diversos trabajos en distintos países (Massapina *et al.*, 1999; Steele y Mulcahy, 1999; Galvão *et al.*, 2000; Berthelin *et al.*, 2001; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Castaños *et al.*, 2009). Según Fabioux (2005), de una manera general, *C. gigas* exhibe un ciclo reproductivo claramente estacional, donde el inicio de la gametogénesis se produciría en invierno, seguido de una fase de gametogénesis intensa en primavera, maduración y puesta en verano y un período de reabsorción en otoño.

En el estudio del ciclo reproductivo en moluscos bivalvos, Lubet (1959) fue uno de los primeros en proponer para el mejillón *Mytilus edulis* una escala gametogénica. Actualmente existen diversas clasificaciones reproductivas, las cuales se basan en caracteres cualitativos como la histología (Quayle, 1969; Yakovlev, 1977; Xie y Burnell, 1994; Steele y Mulcahy, 1999) y caracteres cuantitativos como el peso seco de la carne (Lucas y Beninger, 1985), el índice de condición (Hughes-Games, 1977; Grant y Tyler, 1983; Bodoy, 1986), el diámetro medio de los ovocitos y el área de ocupación de la gónada por gametos (Kennedy y Battle, 1964; Muranaka y Lannan, 1984; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Delgado y Pérez Camacho, 2003), siendo la histología el método más comúnmente utilizado en la determinación del ciclo reproductivo en ostras.

Lowe *et al.* (1982) afirman que los datos de biología reproductiva obtenidos a través del análisis de imagen son más precisos y exactos cuando se comparan con los obtenidos mediante el método estereológico. Meneguetti *et al.* (2004) también apuntan las ventajas del uso del

análisis de imagen como una herramienta que proporciona información precisa de la histología de los tejidos reproductivos mediante el análisis de los variados tipos celulares.

Los métodos utilizados para evaluar la gametogénesis en bivalvos poseen ventajas y desventajas. Barber y Blake (1991) mencionan que el método más completo consiste en la aplicación de por lo menos dos técnicas, una de las cuales puede ser cuantitativa o cualitativa, mientras la otra sería realizada a través del análisis histológico, necesario para verificar los eventos reproductivos relacionados con el desarrollo de los gametos.

En los estudios del ciclo reproductivo de *C.gigas*, la histología aun es el método más comúnmente utilizado y aceptado (Yakovlev, 1977; Mann, 1979; Ruiz *et al.*, 1992a; Massapina *et al.*, 1999; Stele y Mulcahy, 1999; Berthelin *et al.*, 2000; Berthelin *et al.*, 2001; Fabioux *et al.*, 2005; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Royer *et al.*, 2008; Huvet *et al.*, 2010). A través de este análisis es posible verificar el desarrollo de las células gametogénicas, determinándose microscópicamente el estadio del desarrollo gonadal más representativo en la preparación histológica. Los principales periodos del ciclo reproductivo descritos para *C. gigas* son:

a. *Periodo de reposo sexual*

Es la fase posterior a la emisión total de gametos. En esta fase se inicia la reestructuración de los tejidos de reserva, los folículos se comprimen por el crecimiento de las células conjuntivas, musculares y de reserva. Las células vesiculares (células de reserva en *C. gigas*), se localizan principalmente alrededor de los túbulos circulatorios y presentan un aspecto de roseta (Berthelin *et al.*, 2000).

Los folículos se encuentran prácticamente vacíos, donde sólo subsisten las células madres de las gonias, espermatogonias y ovogonias, elementos sobre los que se desarrollará la gónada. La diferenciación de machos y hembras es difícil y se realiza en base a las características de las espermatogonias y ovogonias.

b. *Periodo de multiplicación de las gonias*

Esta fase se caracteriza por la aparición de folículos y acinos gonadales que incrementan su tamaño. Las células germinales que estaban en reposo se activan y se produce un cambio de volumen y morfología nuclear. En las hembras las ovogonias crecen, el núcleo engorda y la cromatina se dispersa en forma de una fina red, para a continuación entrar en mitosis. En los machos, al igual que en hembras, se dan cambios de volumen y morfología nuclear, siendo la cromatina más densa en las espermatogonias que en las ovogonias (Lubet, 1959).

En las secciones histológicas representativas de este período, se encuentran diferentes estados de desarrollo: células madres, espermatogonias y espermatocitos en machos y células madres, ovogonias y ovocitos previtelogénicos en hembras.

Con relación al tejido de reserva, las células vesiculares representan un tejido denso con un patrón característico y ocupan la mayor parte de la gónada (Berthelin *et al.*, 2000).

c. *Gametogénesis*

En esta fase, la foliculogénesis y gametogénesis son intensas, llegando a aparecer los primeros gametos maduros (espermatozoides y ovocitos). Los folículos pasan a ocupar la mayor parte de la masa visceral, reduciéndose la presencia del tejido muscular y conectivo. El tejido de reserva pasa a ser consumido casi que totalmente, desde los ductos genitales hacia el área digestiva. Al final de este periodo, el tejido de reserva está reducido a una fina camada de células vesiculares alrededor del área digestiva (Berthelin *et al.*, 2000).

Los procesos que caracterizan esta fase son la ovogénesis en hembras y la espermatogénesis en machos.

En la ovogénesis, las ovogonias que tapizan las paredes de los folículos entran en la primera división meiótica, quedando detenidas en el diplonema de la profase I. El fin de la primera división meiótica y la segunda división no tienen lugar hasta que los ovocitos son emitidos al agua del mar. Durante la ovogénesis los ovocitos aumentan de tamaño y pasan por dos etapas con características citológicas e histoquímicas distintas: la previtelogénesis y la vitelogénesis.

Durante la previtelogénesis los ovocitos crecen lentamente, los cromosomas están difuminados y el citoplasma enriquecido con ribonucleoproteínas, aumentando el nucléolo de tamaño y sufriendo la primera división nucleolar cuando se aproxima la vitelogénesis (Lubet, 1959).

En la vitelogénesis los ovocitos aumentan de tamaño y acumulan reservas vitelínicas (inclusiones lipídicas, granulación de mucopolisacáridos y plaquetas vitelínicas proteínicas) en el citoplasma. El núcleo sufre un crecimiento importante y la cromatina se va difuminando.

En la espermatogénesis, las espermatogonias van formando una o dos capas periféricas en los acinos gonádicos y al entrar en meiosis podemos observar todos los estadios espermatogénicos estratificados en capas sucesivas y dirigidas hacia el lumen del túbulo. A medida que avanza el desarrollo, el citoplasma va decreciendo en tamaño y las células van siendo más pequeñas. Las espermatogonias dan origen a los espermatocitos primarios por mitosis, en seguida el espermatocito primario pasa a espermatocito secundario iniciando la meiosis y el paso de espermatocito secundario a espermátidas concluye la segunda división meiótica.

Empieza entonces la espermiogénesis, que es la diferenciación de las espermátidas en espermatozoides. En esta etapa los centriolos se disponen perpendicularmente dando lugar a la aparición del flagelo.

d. Maduración

Período donde los gametos maduran, estando al final de esta fase aptos para ser liberados al medio ambiente. En hembras, los ovocitos maduros pasan a ocupar el espacio folicular interior y el contorno celular aparece mucho más regular y redondeado que en etapas anteriores. En individuos completamente maduros, se observa que los contornos de la vesícula germinativa se difuminan, las granulaciones citoplasmáticas invaden progresivamente la vesícula germinal y el nucléolo termina por desaparecer.

En machos los acinos gonadales contienen principalmente espermatozoides que dirigen sus flagelos hacia el eje central del acino. Las otras formas gametogénicas (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas) prácticamente desaparecen.

El tejido de reserva intrafolicular desaparece, estando reducido a una o dos capas de células vesiculares alrededor del área digestiva (Berthelin *et al.*, 2000). Toda el área gonadal es tomada por gametos maduros.

e. Puesta

Una vez alcanzada la maduración existen las primeras liberaciones de gametos que llenan los gonoductos, dejando espacios intrafoliculares. En el caso de los machos, la organización de los espermatozoides direccionando los flagelos de forma concéntrica al lumen del acino es destruida.

La ostra japonesa, normalmente, presenta un único período de puesta en Europa. En Francia, Berthelin *et al.* (2001) estudiando el ciclo reproductivo de dos poblaciones de *C. gigas* encuentran un único período de puesta en julio, la misma conclusión a que han llegado Lango-Reynoso *et al.* (2000) estudiando tres poblaciones en la costa Atlántica francesa. En Irlanda, Steele y Mulcahy (1999) encuentran para esta misma especie un único período de puesta entre agosto y septiembre. Sin embargo, en España, Ruiz *et al.* (1992a) describen dos picos de puesta para la misma especie.

f. Restauración entre puestas sucesivas

En especies que emiten gametos varias veces en la misma época, existe un estado transitorio llamado de restauración entre puestas sucesivas. En esta etapa, el tamaño de los

folículos disminuye, teniendo la apariencia de comprimidos y el número de células en desarrollo aumenta, mientras los gametos maduros disminuyen.

El desarrollo de este fenómeno parece darse con mayor rapidez en machos que en hembras, y la velocidad que define este proceso puede que se encuentre influenciada por factores ambientales y nutricionales.

g. Fin de la estación reproductiva

Después de la última puesta de la estación, los folículos son pequeños y están prácticamente vacíos, restando unos pocos gametos maduros (ovocitos o espermatozoides), con señales de citolisis. Los folículos son invadidos internamente y externamente por hemocitos, con probable función degenerativa.

Los gametos residuales serán reabsorbidos, preparando el área gonadal para un nuevo ciclo de almacenamiento de reservas, transformación de células germinales y gametogénesis.

El proceso de reabsorción de los ovocitos es denominado por algunos autores como atresia (Lucas, 1982; Lubet y Mann, 1987; Pipe, 1987). Este término se aplica a la reabsorción de los ovocitos que alcanzaron la maduración máxima y no fueron liberados al medio (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). La energía obtenida por medio de esta reabsorción podrá ser reinvertida en el metabolismo basal de la ostra (Steele y Mulcahy, 1999).

2.2.4. Factores que regulan el ciclo reproductivo

Los ciclos reproductivos de moluscos bivalvos en general se encuentran regulados por varios factores, los cuales han sido clasificados en algunos trabajos como endógenos y exógenos (Giese, 1959; Lubet y Mann, 1987).

En los moluscos bivalvos se ha demostrado que los cambios estacionales de la biomasa del tejido blando y su relación con el ciclo reproductor reflejan una compleja interacción entre los factores ambientales externos y la respuesta endógena (regulada por el sistema neuroendocrino). Como producto de esta interacción, se establece un orden estacional de los procesos secuenciales del ciclo reproductor (Giese y Pearce, 1974; Sastry, 1979; Mackie, 1984).

Entre los factores exógenos estudiados, los que presentan mayor influencia sobre la reproducción de moluscos bivalvos son la temperatura, el alimento disponible, la salinidad y el fotoperiodo (Mann, 1979; Muranaka y Lannan, 1984; Robinson, 1992a; Ruiz *et al.*, 1992a; Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Otros factores exógenos que pueden afectar el desarrollo gonadal son los sistemas de cultivo, una vez que en los mismos son modificadas la densidad de cultivo de los organismos lo que conlleva a una mayor competencia por el alimento.

Dentro de los factores endógenos hay que destacar las variaciones de los componentes bioquímicos (Sastry, 1979), las neurohormonas, que son los principales mensajeros implicados en la reproducción de bivalvos marinos (Ketata *et al.*, 2007) y la edad, una vez que la especie *C. gigas* es considerada hermafrodita sucesiva protándrica irregular, desarrollando normalmente en el primer ciclo gonadal gametos masculinos (Guo *et al.*, 1998).

a. *Temperatura*

A la temperatura, normalmente, le han asignado el papel principal como inductor del desarrollo gametogénico en *Crassostrea gigas* (Mann, 1979; Deslous-Paoli *et al.*, 1982; Muranaka y Lannan, 1984; Dinamani, 1987; Ruiz *et al.*, 1992a; Steele y Mulcahy, 1999; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Berthelin *et al.*, 2001; Chávez-Villalba *et al.*, 2001; Chávez-Villalba *et al.*, 2003; Castaños *et al.*, 2009; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009; Pogoda *et al.*, 2013).

Algunos autores indican un umbral térmico para el comienzo del desarrollo gametogénico en ostras, entre ellos podemos destacar los trabajos de Mann (1979) que apunta un valor mínimo de 10,5 °C y Fabioux *et al.* (2005) que describe como la maduración de las ostras se alcanzó a temperaturas de 8-10 °C, consecuentemente con valores del umbral térmico más bajos.

La duración de la gametogénesis y el comienzo de la puesta están regulados por la temperatura, de manera que en especies con una amplia distribución geográfica, como la *C. gigas*, la influencia de la latitud sobre el ciclo reproductivo puede correlacionarse con este factor, observándose como en general los animales más cercanos al ecuador tienen una gametogénesis más temprana y de mayor duración que individuos de latitudes más altas (Thompson *et al.*, 1996). Esta afirmación ha sido comprobada en poblaciones de *C. gigas* que se cultivan en la costa de Francia, donde se ha observado que las poblaciones del sur de la costa del Atlántico desovan con un mes de antelación con respecto a las poblaciones que se encuentran en el Norte (Lango-Reynoso *et al.*, 2006). En Portugal, *C. gigas* alcanza la madurez prematuramente e inicia los desoves en abril-mayo, los cuales continúan hasta finales de agosto (Massapina *et al.*, 1999).

Algunos autores también indican la necesidad de alcanzarse una temperatura mínima para el inicio de la puesta. Obviamente que este valor cambia dependiendo de la localización geográfica, y por lo tanto la puesta puede ser más o menos retardada o inexistente. Según Chávez-Villalba *et al.* (2007), *C. gigas* cultivada en México alcanza la maduración, sin embargo no llega a realizar la liberación de los gametos, siendo esta conclusión reforzada por la no existencia de poblaciones salvajes, lo que coincide con lo obtenido por Mann (1979) estudiando ostras introducidas en aguas británicas, donde el agua raramente supera los 18 °C, y que estos

individuos alcanzan la maduración pero casi nunca desovan. Resultados similares fueron obtenidos por Bernard (1974) en la Columbia británica en Canadá.

b. Alimento

En el medio ambiente, la reproducción de moluscos bivalvos dependen de los afloramientos fitoplanctónicos estacionales (Sastry, 1968; Mori, 1979; MacDonald y Thompson, 1988; Ruiz *et al.*, 1992a, b; Thompson *et al.*, 1996; Chávez-Villalba *et al.*, 2001). Maurer y Borel (1986) sugiere que el fitoplancton, potencialmente presente en finales del invierno y principios de primavera, juega un papel fundamental en la acumulación de reservas que permitirán la formación de los gametos.

La cantidad del alimento presente en el medio puede interferir en el proceso de gametogénesis, retardando la maduración gonadal y consecuentemente cambiando la época de puesta, en situaciones de baja cantidad de alimento (Deslous-Paoli, 1982). Por otro lado, en situaciones de abundancia de alimento, ambientes eutróficos, el desarrollo gonadal puede ser amplificado llevando a una hipertrofia de la gónada, que puede provocar desordenes fisiológicos (Kang *et al.*, 2000).

La habilidad de *C. gigas* para responder a la presencia de blooms estacionales de fitoplancton ha sido descrita por Lubet (1976) y Lubet y Mann (1987) y está en concordancia con la hipótesis de que el fitoplancton disponible en el medio podría inducir a la puesta de *C. gigas* en España, propuesta por Ruiz *et al.* (1992a).

La calidad del alimento también puede interferir en la formación y viabilidad de los gametos producidos por moluscos bivalvos. Hendriks *et al.* (2003) han observado una influencia directa de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados sobre la talla de los ovocitos.

c. Salinidad

Los trabajos que evalúan el efecto de la salinidad en el ciclo reproductivo de moluscos bivalvos son escasos, una vez que la mayoría de los cultivos se realizan en zonas que presentan poca variación de salinidad.

Paixão *et al.* (2013) estudiando el ciclo reproductivo de *Crassostrea gasar*, la ostra nativa presente en el norte de Brasil, apunta que la salinidad es la única variable que presenta una variación significativa a lo largo del año y llega a concluir que la salinidad presenta un efecto directo en la maduración gonadal, con ostras maduras en el periodo de baja salinidad y ostras desovadas o en reposo en periodos de alta salinidad. Sin embargo, Lenz y Boehs (2011), estudiando otra especie de ostra nativa de Brasil, la *Crassostrea rhizophorae*, en el Nordeste llega a la conclusión que la disminución de la salinidad puede estimular a la puesta.

En el caso de *Crassostrea virginica*, salinidades inferiores a 7,5‰ afectan a la gametogénesis, pues aunque los espermatozoides se desarrollan normalmente, sin embargo el desarrollo de los ovocitos es anormal (Loosanoff, 1948).

En el caso de la especie que nos ocupa, *C. gigas*, la gametogénesis se ve influenciada por la salinidad, con efectos negativos cuando está expuesta a valores inferiores a 30‰ (Muranaka y Lannan, 1984).

d. *Fotoperíodo*

El fotoperíodo ha sido considerado un factor de relevancia en el control de la reproducción. Es de esperar que en muchos invertebrados marinos exista un importante efecto de control de este factor sobre la reproducción debido a la presencia de fotorreceptores y centros de control endógeno (Giese y Pearse, 1974).

Fabioux *et al.* (2005) estudiaron el efecto del fotoperíodo en la regulación del ciclo reproductivo de *C. gigas* en laboratorio, y pudieron concluir que el fotoperíodo tiene la capacidad de modificar el periodo de la gametogénesis, principalmente en el control de la proliferación gonial y en la maduración de las células germinales.

En pectínidos se ha observado que la gametogénesis se inicia en correlación con el incremento de la longitud de los días en primavera (Sastry, 1970). Por otra parte Duinker (2002) sugiere que este factor ejerce un control determinante en la temporalidad de los cambios de asignación de energía para reproducción o crecimiento en *Pecten maximus*.

e. *Factores endógenos*

La reproducción de los moluscos bivalvos es una respuesta genética a la compleja interacción de factores, siendo que los factores exógenos estimulan los factores endógenos, principalmente la actividad neuroendócrina.

Lubet (1976) tiene la hipótesis que el inicio de la gametogénesis está influenciado por un control interno de las neurosecreciones, que determina el inicio y la duración del ciclo reproductivo. Muchos autores han descrito que el proceso reproductivo en moluscos bivalvos está asociado a cambios en los niveles de neurosecreciones del tejido nervioso y gonádico (Osada *et al.*, 1987; Matsutani, 1990; Osada y Nomura, 1990; Martínez *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2000; Masseau *et al.*, 2002; Siniscalchi *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2006).

La presencia de parásitos, también puede afectar el ciclo gametogénico en moluscos bivalvos. Barber (1996) encuentra que las ostras de la especie *C. virginica* son más susceptibles a las infestaciones parasitarias de *Haplosporidium nelsoni* y *Perkinsus marinus*, que la ostra *C. gigas*. En trabajos con la ostra plana *Ostrea edulis*, se verificó una influencia de los parásitos

Martelia refringes y *Bonamia* sp. sobre la reproducción (Robert *et al.*, 1991; da Silva *et al.*, 2009).

La edad, es otro factor que influencia el ciclo reproductivo de moluscos bivalvos, en especial en especies hermafroditas sucesivas, como es el caso de *C. gigas*, donde la formación del sexo parece estar condicionada a las características ambientales, principalmente a la disponibilidad de alimento, produciéndose machos en el primer ciclo gonadal y en los años con falta de alimento o situaciones con gran competencia por el alimento (Galtsoff, 1964; Guo *et al.*, 1998; Steele y Mulcahy, 1999) y hembras en años con disponibilidad de alimento en el ambiente natural (Fabioux *et al.*, 2005).

Otros factores endógenos son las variaciones de los componentes bioquímicos que están asociados a complejos ciclos de almacenamiento de reservas (Sastry, 1979), los cuales serán más detallados en el siguiente apartado.

2.3. ALMACENAMIENTO Y MOVILIZACIÓN DE RESERVAS ENERGÉTICAS EN OSTRAS

El ciclo estacional de almacenamiento y movilización de reservas energéticas en ostras mantiene una estrecha relación con el ciclo reproductivo y la disponibilidad de alimento en el medio. El esfuerzo reproductivo lleva a grandes gastos energéticos, apoyado por el aporte directo del alimento o por la utilización de reservas previamente almacenadas. La naturaleza de estas reservas y del compartimiento de almacenamiento depende de la especie de bivalvo. Asimismo, dentro de la misma especie, los periodos de movilización de las reservas pueden cambiar ligeramente entre localidades, una vez que las etapas del ciclo reproductivo están influenciadas por factores exógenos (Gabbott, 1975; Bayne, 1975; Sastry, 1979; Fabioux *et al.*, 2005).

Se conocen diferentes mecanismos de coordinación temporal entre el ciclo gametogénico y el ciclo de reservas. Ambos ciclos pueden coincidir o ser opuestos temporalmente. Bayne (1976), basándose en la relación entre el desarrollo gonadal y la acumulación y utilización de nutrientes, clasifica las especies como conservativas u oportunistas.

En las especies conservativas la gametogénesis ocurre en otoño-invierno a expensas de las reservas previamente adquiridas en verano, dando lugar a una relación opuesta entre los niveles de reservas y la biomasa de la gónada. Por otro lado, en las especies oportunistas la gametogénesis ocurre en primavera cuando existe una abundancia de alimento en el medio, produciéndose el desarrollo gametogénico paralelo a la acumulación de reservas. Ambas estrategias reproductivas pueden considerarse adaptaciones a las condiciones ambientales en las

que vive el animal, encontrándose especies con estrategias intermedias que utilizan tanto las reservas almacenadas como el alimento disponible en el medio natural (Sastry, 1979).

2.3.1. Tejido de reserva

La función del tejido de reserva, por línea general, queda dividida en dos fases, una de almacenamiento de nutrientes y una fase de movilización, variando los mecanismos implicados en estos procesos según la especie (Mathieu y Lubet, 1993).

En ostras, un único tipo celular es observado en el tejido de reserva, son las células vesiculares del tejido conectivo, también llamadas de células de glucógeno (Lubet, 1994). Estas células son consideradas un tipo celular intermedio entre las células adipogranulares y las células vesiculares previamente descritas en *M. edulis* (Galtsoff, 1964; Mathieu y Lubet, 1993; Berthelin *et al.*, 2000). Las células vesiculares del tejido conectivo se encuentran principalmente en los palpos labiales, en el manto y área gonadal, en la base de las branquias y alrededor del tracto digestivo.

El volumen del tejido de reserva presenta una relación inversa con el desarrollo de los túbulos gonadales. Durante la maduración, el área gonadal llega a estar ocupada un 95% por la gónada, disminuyendo hacia un 20% en el reposo sexual, mientras el tejido de reserva presenta una evolución del 5 hacia el 60% (Berthelin *et al.*, 2001).

La evolución del tejido de reserva durante la gametogénesis puede ser dividida en cuatro estadios, similares para machos y hembras. El estadio A, presente en ostras desovadas, donde empieza la reestructuración del tejido de reserva y las células vesiculares están en pequeño número ocupando principalmente las paredes de los túbulos circulatorios. El estadio B, que ocurre durante el invierno, cuando las células vesiculares ocupan la mayor parte del área gonadal. El estadio C, representado por el periodo de maduración gonadal, que conlleva a una reducción de las células vesiculares, quedando al final de este periodo una fina camada de células contiguas al área digestiva, y por último el estadio D, presente en ostras completamente maduras, donde las células vesiculares ocupan una o dos capas contiguas a los túbulos circulatorios (Berthelin *et al.*, 2000).

2.3.2. Variación estacional de los componentes bioquímicos

La evolución estacional de los componentes bioquímicos en *C. gigas* ha sido estudiada en diversos países (Linehan *et al.*, 1999; Massapina *et al.*, 1999; Berthelin *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003; Dridi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Pogoda *et al.*, 2013). De una manera general, el patrón seguido por cada uno de los componentes está estrechamente relacionado al estado de madurez sexual del animal y al suministro energético, soportado por el aporte directo de

nutrientes como también por la utilización de las reservas previamente almacenadas, existiendo una clara relación entre ambos factores (Navarro *et al.*, 1989).

En general, la variación de los componentes bioquímicos en relación con el ciclo reproductivo se debe a la movilización de sustancias de reserva para sostener el desarrollo gonadal, así por ejemplo en ostras, las reservas energéticas son constituidas esencialmente de glucógeno, sin embargo, algunos lípidos también pueden ser almacenados (Gabbott, 1983).

En los bivalvos marinos, las reservas energéticas están esencialmente constituidas por carbohidratos y en especial el glucógeno (Mathieu y Lubet, 1993). Esto ha sido demostrado por la correlación negativa entre el índice de condición y el contenido de carbohidratos en muchas especies. En la mayoría de los bivalvos marinos, el glucógeno tiene un papel central en el soporte energético del metabolismo de mantenimiento y en la gametogénesis (Bayne *et al.*, 1982; Ruiz *et al.*, 1992a, b).

En *C. gigas*, se ha reportado que las reservas de glucógeno son utilizadas en primavera durante la gametogénesis, hasta alcanzar valores mínimos durante el verano cuando ocurre la puesta, y posteriormente las reservas de glucógeno se incrementan a partir del verano hasta el inicio del invierno (Galtsoff, 1964; Deslous-Paoli y Héral, 1988), cuando en algunas zonas geográficas normalmente ocurre el principal afloramiento fitoplanctónico (Lubet y Mann, 1987; Mathieu y Lubet, 1993).

Normalmente, en los moluscos bivalvos, se relaciona la reducción del contenido en glucógeno, en los órganos de reserva, con un aumento del contenido en lípidos en la gónada (Fernández-Reiriz *et al.*, 1996). Además de la utilización de las reservas de glucógeno para la síntesis de lípidos o lipogénesis, los moluscos bivalvos, almacenan y transfieren lípidos desde la glándula digestiva hacia las gónadas durante la maduración (Barber y Blake, 1981; Allen y Conley, 1982; Pazos *et al.*, 1997; Berthelin *et al.*, 2000; Parra *et al.*, 2005; Dridi *et al.*, 2007). Lo anterior concuerda con los altos valores energéticos en gónadas de *C. gigas*, atribuidos al alto contenido de lípidos, en particular en hembras y en menor contenido en machos (Deslous y Héral, 1988).

Soudant *et al.* (1998) han constatado la existencia de diferencias en cuanto a la cantidad y composición de lípidos entre la gónada masculina y femenina, de manera que los lípidos en la gónada masculina se asocian fundamentalmente con funciones estructurales, como componentes de las membranas, mientras que en la gónada femenina, son utilizados tanto como sustancias estructurales como de reserva.

Los lípidos son las fuentes de energía más eficientes, una vez que ofrecen mucho más energía metabólica que la misma cantidad de carbohidratos (glucógeno) o proteínas (Pogoda *et al.*, 2013). Además, constituyen un componente de gran importancia en los ovocitos de los bivalvos (Holland, 1978; Gabbott, 1983). También ha sido descrito que los lípidos aportan

energía durante el crecimiento de invierno, cuando los carbohidratos ya fueron consumidos (Beninger y Lucas, 1984).

Las proteínas son los componentes mayoritarios tanto en los tejidos de reproductores de *C. gigas* (Deslous-Paoli y Héral, 1988), como en los huevos de *C. virginica* (Lee y Heffernan, 1991) y *C. gigas*, por lo tanto son importantes en la dieta de los reproductores que influyen sobre la maduración y eventualmente sobre la calidad de los desoves y el desarrollo larvario (Massapina *et al.*, 1999).

Por otra parte, el uso de las proteínas como fuente de energía parece producirse sólo cuando las reservas de carbohidratos han sido ampliamente reducidas (Barber y Blake, 1981, Larretxea, 1995; Pérez-Camacho *et al.*, 2003), estando por lo tanto sujetas a transformaciones metabólicas, pero no sometidas a importantes procesos de acumulación como lípidos o carbohidratos (Gabbott, 1976).

2.4. CULTIVO DE OSTRAS

2.4.1. Cultivo de ostras en el mundo

El cultivo de ostras u ostricultura como actividad se viene ejerciendo desde muy antiguo, situándose su inicio hace unos 4.000 años, época en la que japoneses, griegos y romanos las cultivaban con grandes éxitos. En Europa la ostricultura data de al menos dos mil años. Se reconoce al romano Sergius Orata como el “padre” de la ostricultura europea, cuando en 160 a.C. organizó los primeros parques ostrícolas en la bahía de Nápoles. Sin embargo, solo a finales del siglo XIX, entre 1860 y 1870, que se empezó la ostricultura francesa moderna, en la bahía de Arcachon (Lubet y Mathieu, 1999).

Actualmente, en el mundo, se cultivan cerca de 12 especies de ostras, con una producción en el año de 2010 de aproximadamente 4,5 millones de toneladas. Aunque la ostricultura está básicamente dominada por la ostra japonesa *C. gigas*, con un 96 % de la producción ostrícola mundial (4,3 millones de toneladas). Esta especie es cultivada en la mayoría de los países, siendo China, Corea, Japón, Francia, Taiwán y EE.UU. los principales productores. El dominio del mercado por este tipo de ostra se explica por el acelerado ritmo de crecimiento, bajo nivel de mortalidad y la facilidad en su cultivo.

El cultivo de la ostra *C. gigas* se inició en Japón y es precisamente en ese país en donde la ostricultura es más sofisticada y productiva, practicándose el cultivo sobre bateas y long-lines. En Europa la ostra japonesa fue introducida en los parques de cultivo franceses como especie sustitutiva y alternativa, para la supervivencia del importante y tradicional sector ostrícola, en primer lugar como sustitución de la especie *C. angulata* y en los años setenta ante

el deterioro del cultivo y mortalidades sucesivas de la ostra plana *O. edulis*. Esta especie alóctona “salvó” el sector ostricultor de Francia, que supo orientar y acostumbrar al selectivo mercado francés, e igualmente, al italiano, al consumo de esta especie.

2.4.2. Cultivo de ostras en España

Diversos escritores romanos hablan del traslado de ostras desde Galicia a la capital del Imperio Romano (Pérez-Camacho *et al.*, 1973). En España, en la Edad Media tenemos referencias sobre el aprovechamiento y explotación de la riqueza ostrícola. Ya a finales del siglo XVIII se presta una especial atención al desarrollo de la ostra plana, precisamente en un estudio de Cornide Saavedra y Lucas Labrada en el que se describen el sector pesquero gallego e indican la desaparición progresiva de los bancos de ostra en la Ría de Ferrol y Ría de Vigo, a raíz de este estudio surge el primer intento de introducir la ostricultura moderna, creándose en 1847 las Escuelas prácticas de Ostricultura de Ortigueira (La Coruña) y Puerto de Santa María (Cádiz), que solo funcionan diez años (Torres y Corral, 2001).

A partir de este momento, se importan en diferentes ocasiones semillas de Francia, pero sin gran éxito. Solo a partir de 1965, utilizándose semillas de 18 meses procedentes de Francia, que se cultivaban entre marzo y noviembre en cajas ostrícolas en parques o bateas, se desarrolla la ostricultura gallega. En estos años llegaron a registrarse hasta 800 emplazamientos para instalaciones de cultivo de ostra en las rías gallegas y paralelamente también se desarrollan áreas del litoral (principalmente en las Rías altas de Ortigueira y Ribadeo), en que se promueven los cultivos en zonas intermareales. En esta época se desarrollan diferentes materiales para cultivar ostras, donde podemos destacar el cultivo en cuerdas con cemento desarrollado por Andreu en 1967 y los cestos ostrícolas (Pardellas y Polanco, 1987).

La gran demanda por la ostra plana hizo con que los bancos naturales prácticamente desapareciesen. Paralelo a esto, las importaciones sucesivas de ostra plana de Francia propiciaron también el transporte de diferentes parásitos, en primera instancia *Marteilia refringens* y posteriormente una segunda infección masiva provocada por *Bonamia ostreae* (Montes *et al.*, 1990), haciendo que el cultivo de esta especie se volviera inviable.

Con vistas a mantener la ostricultura gallega, se permitió la importación de la ostra *Crassostrea gigas* con carácter experimental. En 1991 se autorizaron las primeras pruebas de cultivo de *C. gigas* en 16 bateas, con el fin de valorar la viabilidad de esta especie desde un punto de vista productivo y ecológico (Xunta de Galicia, 1992). Desde entonces y hasta el presente, los productores han continuado su actividad en el marco de estas autorizaciones. Su introducción en Galicia en 1991 supuso un gran avance en el sector ostrícola, por su mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *Ostrea edulis* de cultivo tradicional y autóctona de esta zona (Fernández *et al.*, 2002). Pero aún existe una gran necesidad

de estudios más profundos acerca del cultivo de *C. gigas* para las condiciones ambientales de las zonas de cultivo de las costas gallegas.

Los datos de producción de Galicia, apuntan que la ostra japonesa *C. gigas* representó en 2012, entre los moluscos bivalvos, el cuarto producto de mayor venta, con una producción de 293 toneladas (Fuente: pescagalicia.com).

2.4.3. Factores que afectan al cultivo de ostras

Un cultivo de ostras exitoso depende en gran medida de la adaptación de las prácticas de manejo a las características locales. En otras palabras, la metodología específica utilizada para una determinada especie en un lugar específico pueden promover mejores resultados y aumentar la productividad (Maccachero *et al.*, 2007).

La elección del sistema de cultivo a utilizar es una importante cuestión que debe ser discutida antes de iniciar cualquier inversión. En Galicia son escasos los trabajos que evalúan el cultivo de *Crassostrea gigas*. Los sistemas utilizados para el cultivo de *C. gigas* en las Rías gallegas fueron el de cestas ostrícolas plásticas y el de pegado en cuerdas, utilizados en las Rías de Arousa y Vigo y el de cultivo intermareal empleando sacos ostrícolas comerciales (poches) en la Ría de Ribadeo (Guerra *et al.*, 1987; Guerra *et al.*, 1995; Iglesias *et al.*, 2005). Sin embargo, estos trabajos no llegan a conclusiones que permitan determinar el mejor sistema de cultivo para las condiciones presentes en las Rías gallegas.

Otra importante cuestión en el cultivo de moluscos es determinar cuál es el número máximo de individuos de una cierta especie que puede ser cultivado en una estructura de cultivo, antes de que su crecimiento sea limitado o que los valores de mortalidad se vuelvan inaceptables. En otras palabras, ¿cuál sería la densidad de cultivo óptima?

Es sabido que altas densidades pueden disminuir la tasa de crecimiento de bivalvos (Fréchette y Bourget, 1985; Newell, 1990; Holliday, 1991; Parsons y Dadswell, 1992; Taylor *et al.*, 1997a, b; Román *et al.*, 2003), posiblemente debido a la limitación de alimento a altas densidades (Harvey y Vincent, 1991; Vincent *et al.*, 1994). En contraposición, una densidad baja puede incluso incrementar la variabilidad en la masa corporal, dado que algunos individuos crecen más rápido que otros (Kautsky, 1982; Jarayabhand, 1988). Incluso con una pequeña cobertura superficial de la estructura de cultivo, donde hay una mayor distancia entre los individuos, puede haber disminuciones significativas en el crecimiento (Peterson, 1982, Peterson y Black, 1987).

3. *BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA OSTRA JAPONESA*
Crassostrea gigas EN LA RÍA DE AROUSA

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA OSTRA JAPONESA *Crassostrea gigas* EN LA RÍA DE AROUSA

3.1. INTRODUCCIÓN

La ostra plana, *Ostrea edulis*, fue durante muchos años el principal molusco recolectado en las costas gallegas, pero, debido a una explotación fuera de control entre los años 50 y 60, los bancos naturales de las rías de Vigo, Arousa y Muros prácticamente desaparecieron. Paralelamente a la disminución de los recursos naturales, comenzó el desarrollo de su cultivo, siendo instaladas más de 300 bateas en las rías gallegas con una producción aproximada de 100 millones de ostras. Este cultivo se realizaba partiendo de ostras jóvenes, importadas de Francia e Italia, que se pegaban con cemento a las cuerdas de cultivo (Iglesias *et al.*, 2005).

El desarrollo de este cultivo se vio frenado al detectarse una elevada mortandad en las ostras importadas, debido primero al protozooario *Marteilia refringens* y posteriormente a una segunda infección provocada por *Bonamia ostreae* (Montes *et al.*, 1990), que se extendió en las diferentes zonas de suministro, hasta hacer inviable el cultivo de esta especie.

La especie *Crassostrea gigas*, nativa del sudeste asiático, incluyendo el mar del Japón, China y Corea, conocida como ostra del pacífico o japonesa, asume importancia mundial por presentar características favorables al cultivo (Akaboshi *et al.*, 1983). Las tecnologías de producción de larvas y semillas de esta especie posibilitaron que países como EE.UU., Reino Unido, Francia y en menor escala Chile, México y Australia entre otros, adoptasen el cultivo de *C. gigas* como actividad económica y fuente alternativa de alimento (Chew, 1986).

Los datos de la FAO apuntan una producción inicial de *C. gigas* en España de 900 t en el año de 1964, sin embargo, su introducción en Galicia fue liberada solo en 1991, cuando el gobierno autonómico autorizó su cultivo experimental en bateas con el fin de valorar la viabilidad del cultivo de esta especie desde un punto de vista productivo, pero también ecológico (Xunta de Galicia, 1992). El cultivo de esta ostra supuso un gran avance en el sector ostrícola, por su mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), de cultivo tradicional y autóctona de esta zona (Fernández *et al.*, 2002). Lo que provoca una gran necesidad de estudios más detallados acerca de la biología reproductiva y del ciclo de producción de *C. gigas* bajo las características ambientales en las costas españolas, con especial énfasis en las zonas de producción gallegas.

El estudio de la reproducción es de interés básico en el conocimiento de la biología de una especie, particularmente si el animal es comestible y existe interés económico en su cultivo (Nascimento, 1978).

Existen importantes variaciones en los ciclos de maduración de bivalvos, asociados con factores ambientales y genéticos. Los ciclos reproductivos están controlados por ritmos endógenos específicos sincronizados por factores externos, de entre los cuales la temperatura y la alimentación parecen ser los más importantes (Thompson *et al.*, 1984).

Tradicionalmente, a la temperatura se le ha asignado un papel primordial en el control de la reproducción (Mann, 1979). Existen diversos trabajos que relacionan el ciclo reproductivo con las variaciones estacionales de la temperatura en el medio natural (Loosanof and Davis, 1952; Kanti *et al.*, 1993; Saout *et al.*, 1999; Berthelin *et al.*, 2001; Chícharo y Chícharo, 2001; Jeffs *et al.*, 2002; Borzone *et al.*, 2003; Choi y Chang, 2003; Darriba *et al.*, 2004; Beltrán-Lugo *et al.*, 2006; Drummond *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2009) siendo diferente la influencia de este factor entre las especies.

En el estudio del desarrollo gonadal en moluscos bivalvos, Lubet (1959) fue uno de los primeros en proponer para el mejillón *Mytilus edulis* una escala gametogénica. Actualmente existen diversas clasificaciones reproductivas, las cuales se basan en caracteres cualitativos como la histología (Quayle, 1969; Yakovlev, 1977; Xie y Burnell, 1994; Steele y Mulcahy, 1999) y caracteres cuantitativos como el peso seco de la carne (Lucas and Beninger, 1985), el índice de condición (Hughes-Games, 1977; Grant y Tyler, 1983; Bodoy *et al.*, 1986), el diámetro medio de los ovocitos y el área de ocupación de la gónada por gametos (Kennedy y Battle, 1964; Muranaka y Lannan, 1984; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Delgado y Pérez Camacho, 2003), siendo la histología el método más comúnmente utilizado en la determinación del ciclo reproductivo en ostras.

Diversos trabajos previos han correlacionado los estadios de desarrollo con características histológicas que pueden ser reconocidas de forma general en todos los moluscos bivalvos (Lango-Reynoso *et al.*, 2000), estableciendo escalas de desarrollo gonadal. Sin embargo, la determinación de estadios es frecuentemente subjetiva y existe poca concordancia en relación a los criterios utilizados para establecer el número de estadios de desarrollo que deben ser incluidos en la escala de clasificación (Barber y Blake, 1991).

Lowe *et al.* (1982) afirman que los datos de biología reproductiva obtenidos a través del análisis de imagen son más precisos y exactos cuando se comparan con los obtenidos mediante el método estereológico. Meneguetti *et al.* (2004) también apuntan las ventajas del uso del análisis de imagen como una herramienta que proporciona información precisa de la histología de los tejidos reproductivos mediante el análisis de los variados tipos celulares.

Los métodos utilizados para evaluar la gametogénesis en bivalvos poseen ventajas y desventajas. Barber y Blake (1991) mencionan que el método más completo consiste en la aplicación de por lo menos dos técnicas, una de las cuales puede ser cuantitativa o cualitativa, mientras la otra sería realizada a través del análisis histológico, necesario para verificar los eventos reproductivos relacionados con el desarrollo de los gametos.

El presente capítulo tiene como objetivo determinar el patrón del ciclo reproductivo de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* cultivada en batea en la Ría de Arousa, mediante técnicas cuantitativas y cualitativas, estableciéndose la época de puesta, además de evaluar la influencia de los factores ambientales sobre el desarrollo gonadal.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Área de estudio y muestreo

El estudio de la biología reproductiva se llevó a cabo con ostras de dieciséis meses que estaban siendo cultivadas en una batea de la Ría de Arousa, más específicamente en el Polígono A7 de O Grove (42° 30' 30" N, 8° 51' 54" W). Estas ostras habían sido importadas de Francia en abril de 2007, con aproximadamente 7 meses de vida. Las ostras estaban siendo cultivadas en jaulas patentadas por el IEO en una densidad de aproximadamente 40 ostras por cesta.

Para este estudio, se recogieron muestras de 60 ostras con intervalos de aproximadamente un mes, durante el período de enero de 2008 hasta octubre de 2009. Una vez recogidas, las ostras fueron conducidas hasta el Centro Oceanográfico da Coruña del Instituto Español de Oceanografía (IEO), donde se realizaron los muestreos. En estos muestreos, cada ostra fue medida (longitud y anchura) con un calibre con una precisión de 0,1 mm y pesada (peso total, peso fresco de las valvas y peso fresco de las partes blandas) utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Para el peso fresco de las partes blandas, éstas se dejaron en papel absorbente, para retirar el exceso de agua, antes de proceder el pesaje.

3.2.2. Índice de Condición

Para la determinación del Índice de Condición, se utilizó la expresión descrita por Walne y Mann (1975), la cual se calcula como: $IC = (P1 \times 1000)/P2$. Donde P1 es el peso seco de las partes blandas de 20 ostras y P2 es el peso seco de las valvas de las mismas 20 ostras.

Las partes blandas de 20 ostras (10 machos y 10 hembras) fueron liofilizadas por 48 h en un liofilizador para un posterior análisis bioquímico (datos presentados en el capítulo 4). Las valvas de estas mismas 20 ostras fueron puestas en recipientes tarados y se secaron en estufa a 40 °C hasta alcanzar peso constante. Posteriormente se estandarizó el índice de condición a una talla media, representada por la longitud media durante todo el periodo de muestreo (90,1 mm).

3.2.3. Análisis histológico

Los estadios de maduración se establecieron a través del análisis histológico del tejido gonadal de aproximadamente 20 ostras por muestreo (10 machos y 10 hembras). Para ello, se fijó en líquido de Bouin durante 24 horas la sección de carne comprendida entre los palpos labiales y la cavidad pericárdica. Esta sección se conservó en alcohol 70°, para su posterior deshidratación mediante baños sucesivos en alcohol de diferente gradación. La eliminación de

los restos de alcohol se realizó en un medio soluble en parafina (xileno) y posteriormente se incluyeron en parafina (Bayer (55 – 57 °C)) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Protocolo de deshidratación e inclusión en parafina.

Reactivo	Tiempo de inmersión
Alcohol 70°	Hasta eliminar restos del fijador
Alcohol 96°	Una hora
Alcohol 96°	Una hora
Alcohol 100°	Dos horas
Alcohol 100°	Una hora
Xileno	Una hora
Xileno	Una hora
Parafina líquida (60 °C)	Una hora
Parafina líquida (60 °C)	Una hora

Los bloques de parafina, mantenidos a 4 °C, fueron cortados a dos profundidades, en secciones de 5 µm. Las secciones resultantes se estiraron en un baño de agua destilada a 45 °C, se recogieron en un portaobjetos (dos secciones por portaobjetos) y se secaron al aire.

El siguiente paso consistió en el desparafinado de las secciones dispuestas en el portaobjetos y la tinción. Los portaobjetos se tiñeron con la tinción tricrómica propuesta por Wheatley (1951) modificada (Tabla 3.2), utilizando el kit comercial Para-Park Trichrome Stain. Posteriormente se procedió al montaje con medio sintético (DPX).

Tabla 3.2. Protocolo de tinción tricrómica propuesta por Wheatley (1951) modificado.

Reactivo	Tiempo de inmersión
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Tinción tricrómica	Dos inmersiones
Solución B*	Aproximadamente 1 minuto
Alcohol 96°	1 minuto
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Xileno	5 minutos

* Solución B = 995 ml de alcohol 90° y 5 ml de ácido acético glacial.

Para cada individuo se analizaron, utilizando un microscopio, dos portaobjetos conteniendo en cada uno de ellos dos secciones de la ostra. Cada portaobjetos corresponde a una profundidad diferente del cuerpo del animal, garantizando la representatividad de los datos respecto al total de la gónada.

La determinación de los estadios de desarrollo gonadal se realizó utilizando la escala descrita por Lubet (1959), con una modificación, donde se agruparon los estadios IIIA1 y IIIA2 en un único estadio IIIA (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Escala de desarrollo gonadal de Lubet (1959) modificada y su descripción.

Estadio	Descripción
0 (reposo sexual)	Los folículos se comprimen, sólo subsisten las células madres de las gonias, espermatogonias y ovogonias, elementos sobre los que se desarrollará la gónada. La diferenciación de machos y hembras se realiza en base a las características de las espermatogonias y ovogonias
I (multiplicación de las gonias)	Las células germinales en reposo se activan y se produce un cambio de volumen y morfología nuclear. Se encuentran diferentes estados de desarrollo: células madres, espermatogonias y espermatoцитos en machos y células madres, ovogonias y ovocitos previtelogénicos en hembras.
II (gametogénesis)	La foliculogénesis y gametogénesis son intensas, llegando a aparecer los primeros gametos maduros (espermatozoides y ovocitos).
IIIA (maduración)	Período donde los gametos maduran, estando al final de esta fase aptos para ser liberados al medio ambiente.
IIIB (puesta – vaciado total o parcial)	Una vez alcanzada la maduración, existen las primeras liberaciones de gametos que llenan los gonoductos, dejando espacios intrafoliculares.
IIIC (restauración entre puestas sucesivas)	El tamaño de los folículos disminuye, teniendo la apariencia de comprimidos. El número de células en desarrollo aumenta, mientras los gametos maduros disminuyen.
IIID (fin de la estación de reproducción)	Después de la última puesta de la estación, los folículos son pequeños y están prácticamente vacíos, restando unos pocos gametos maduros (ovocitos o espermatozoides), con señales de citolisis. Los folículos son invadidos internamente y externamente por hemocitos, con probable función degenerativa.

La proporción sexual (sex-ratio), establecida como la relación del número total de machos y hembras, se comparó en cada muestreo así como el promedio total durante el periodo de estudio, aplicándose el test no paramétrico del χ^2 con un nivel de significancia $\alpha = 5,0\%$.

La época de puesta fue evaluada a través de la distribución de frecuencia mensual de los diferentes estadios de maduración en relación al índice de condición, al índice de ocupación gonadal y a la talla media de los ovocitos, en el caso de las hembras.

3.2.4. Análisis de imagen

Para el análisis de imagen, se hicieron al azar, dentro del área gonadal, una imagen por sección, como matriz de píxeles, con una cámara digital acoplada al microscopio, haciendo un total de cuatro imágenes por individuo. Estas imágenes fueron capturadas de los portaobjetos previamente preparados para la determinación de los estadios con un aumento de 200x.

Cada imagen se analizó utilizando el programa MICROIMAGE determinándose el índice de ocupación gonadal (IOG) en ambos sexos.

El índice de ocupación gonadal descrito por Delgado y Pérez Camacho (2003), se define como el porcentaje del área analizado que está ocupado por gametos y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{IOG} = (\text{área ocupada por gametos} / \text{área del campo analizado}) \times 100$$

La determinación del IOG en el caso de los machos está basada en la distinción cromática producida por la tinción utilizada, que permite agrupar los gametos y medir el área ocupada, mientras que en el caso de las hembras se realizó un contaje y medición automático, seleccionando los objetos por rango de color y tamaño, determinándose el área y diámetro máximo de cada ovocito. Después de la primera selección, se realiza una supervisión y corrección de los posibles errores del modo automático, a través del modo manual. Sumándose el área de todos los ovocitos por imagen se obtiene el área ocupada por los gametos. En ambos casos el área de la imagen es de 140000 μm^2 .

Otro parámetro que ha sido tenido en cuenta en el caso de las hembras es la variación de tamaño que sufren los ovocitos a medida que se produce la maduración. Para eso se evaluó la talla media de los ovocitos, la cual es obtenida a través de la medición del diámetro máximo de cada ovocito. Este proceso fue realizado en dos etapas, donde en la primera se miden todos los ovocitos y en la segunda solamente los ovocitos que presentan la vesícula germinal bien definida. Esta doble medición fue realizada con el objetivo de verificar la existencia de diferencias significativas entre los dos métodos, una vez que muchos autores (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Meneghetti *et al.*, 2004; Williams y Babcock, 2004; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Normand *et al.*, 2008) indican el método donde solamente se miden los ovocitos con vesícula germinal bien definida, como el método más preciso.

3.2.5. Variables ambientales

Los datos de temperatura y salinidad en la columna de agua a una profundidad de 0-5 metros, fueron obtenidos, por una sonda CTD Sea-Bird 25. Los datos de clorofila *a* fueron obtenidos por el filtrado a presión constante de un volumen de 100 mL de agua a una profundidad de 0-5 metros, separando las partículas en dos clases $>2,7\mu\text{m}$ y $<2,7\mu\text{m}$, las cuales fueron sumadas para representar el dato de clorofila *a*. La extracción de la clorofila *a* presente en los filtros de fibra de vidrio realizase en acetona al 90% resfriada y en oscuridad por no menos que 14 horas. Posteriormente se analizan por espectrofotometría por medio de una ecuación tricromática, siguiendo el método de Neveaux y Panouse (1987). Todos los datos fueron obtenidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia, en una estación meteorológica ubicada cercana a la batea de cultivo en el polígono A7 de O Grove. Estos datos fueron proporcionados por el INTECMAR en el marco de un convenio entre éste y el IEO para la toma de datos oceanográficos en las Rías Gallegas.

3.2.6. Presentación de los datos y análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Plus 5.1.

Para todos los datos se analizó la normalidad mediante el test de Kolgomorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, cuando presentaban el mismo número de datos, y de Bartlett cuando presentaban un número distinto. Cuando los datos son normales y las varianzas homogéneas se realizó el Análisis de Varianza Simple (ANOVA) y en los casos en que los datos no se adecuaban a la distribución normal o las varianzas no fueran homogéneas se utilizó el Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis. Para los tests a posteriori se utilizaron el test de Student-Newman-Keuls (SNK) para los datos analizados por ANOVA y el test de Mann-Whitney, comparando datos pareados, cuando los datos seguían una distribución no paramétrica. En todos los casos se utilizó un α de 5%.

Los datos del IOG se transformaron utilizando la transformación arcoseno.

Para verificar la relación e influencia de las variables ambientales sobre el índice de ocupación gonadal (IOG) e índice de condición (IC) se realizaron análisis de regresión múltiples obteniéndose los valores de R^2 de los modelos, así como los Coeficientes de Correlación de Pearson.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Proporción sexual

Se muestrearon un total de 538 ostras, de las cuales 50,19% fueron machos, 42,01% hembras, 5,39% indeterminadas y 2,42% hermafroditas simultáneos. La evolución de la proporción de los sexos está representada en la figura 3.1.

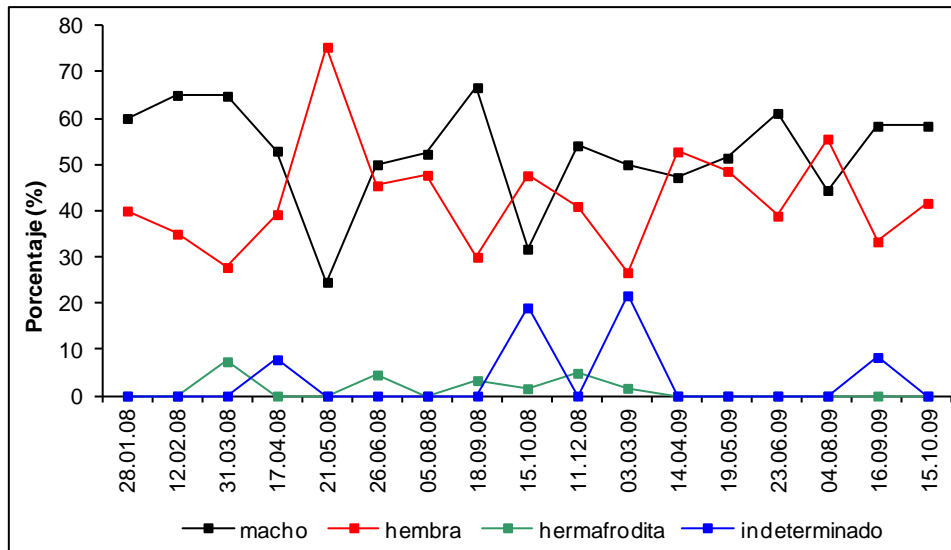


Figura 3.1. Evolución de la proporción sexual de *Crassostrea gigas* cultivada en la Ría de Arousa.

La proporción sexual (machos:hembras) durante todo el período de estudio fue de 1,35:1. De acuerdo con el test del χ^2 la proporción de machos es significativamente mayor que la de hembras cuando se analiza el promedio total durante el periodo de estudio. En el análisis mensual, la proporción de machos fue significativamente superior en los muestreos de marzo de 2008 (2,33:1), septiembre de 2008 (2,22:1) y marzo de 2009 (1,88:1), mientras las hembras presentaron una proporción superior en el muestreo de mayo de 2008 (1:3,07).

3.3.2. Índice de Condición (IC)

La evolución del índice de condición (IC) para machos y hembras está representada en la figura 3.2. Los valores del IC en ambos sexos se incrementan, en el primer año, hasta el muestreo de mayo, donde alcanzan el máximo valor medio de $86,53 \pm 19,18$ en machos y $78,53 \pm 25,25$ en hembras, no existiendo diferencias significativas ($P > 0,05$, ANOVA) entre estos valores.

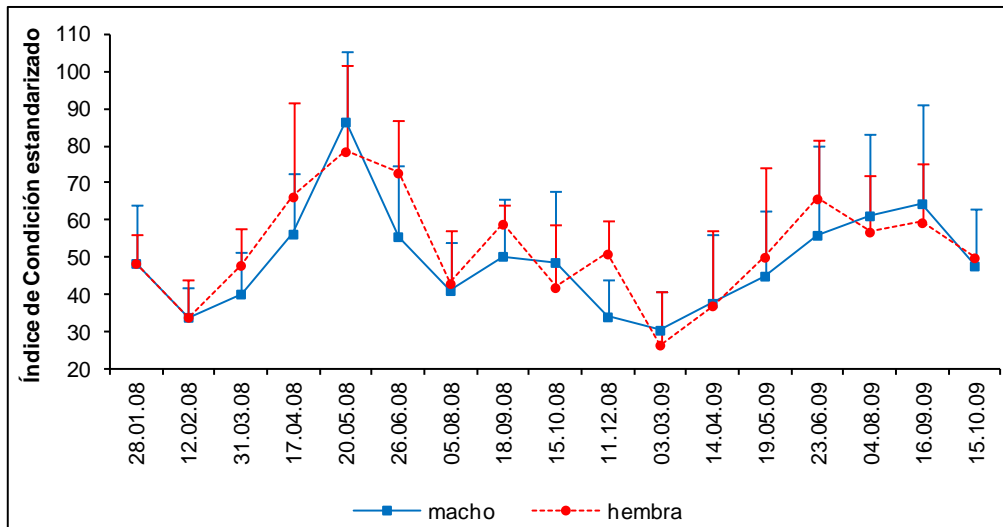


Figura 3.2. Evolución del Índice de Condición para machos (dato medio + de) y hembras (dato medio + de) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa.

Los machos presentaron una disminución significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) del valor del IC entre los meses de mayo y junio de 2008, mientras que las hembras experimentaron un descenso significativo de sus valores de IC ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) entre los muestreos de junio y agosto de 2008.

Posteriormente, entre agosto y septiembre, hay una rápida recuperación del IC, haciendo que los valores medios se incrementen de $41,15 \pm 13,21$ a $50,38 \pm 15,34$ en los machos y de $43,03 \pm 14,02$ a $59,01 \pm 14,42$ en las hembras, aunque este incremento no es significativo ($P > 0,05$, ANOVA, SNK). Entre los muestreos del septiembre y diciembre de 2008 ocurre la segunda disminución del IC, siendo ésta no significativa en ambos los sexos ($P > 0,05$, ANOVA, SNK).

Durante el segundo año de muestreo los individuos presentaron un incremento del IC menos pronunciado que el primer año, alcanzando valores máximos de $64,53 \pm 26,50$ en los machos en el muestreo de septiembre de 2009 y de $65,83 \pm 24,30$ en las hembras en el muestreo de junio de 2009.

Las hembras presentaron una disminución del IC entre los muestreos de junio y agosto de 2009, sin embargo esta disminución no fue significativa ($P > 0,05$, ANOVA, SNK). En los machos la evolución de los valores del IC presenta un incremento constante hasta el muestreo de septiembre de 2009, aunque con una gran variación que puede ser observada a través de los datos de desviación estándar. Entre los meses de septiembre y octubre de 2009 ocurre una disminución del IC en machos, pero no significativa ($P > 0,05$, ANOVA, SNK).

Comparando la evolución del IC entre machos y hembras, se observó la existencia de solo una diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK), en el último muestreo del primer año (11/12/2008), con valores significativamente más altos en las hembras.

3.3.3. Índice de Ocupación gonadal (IOG)

En la figura 3.3 se representa la evolución del IOG para machos y hembras. Como puede observarse, los valores del IOG en ambos sexos aumentan conforme avanza el período reproductivo, alcanzando su máximo en primavera, en el muestreo de mayo de 2008, con los valores de $50,63 \pm 4,41\%$ para machos y $51,23 \pm 4,72\%$ para hembras y sus valores mínimos en invierno ($19,63 \pm 14,47\%$ y $7,40 \pm 2,97\%$ respectivamente).

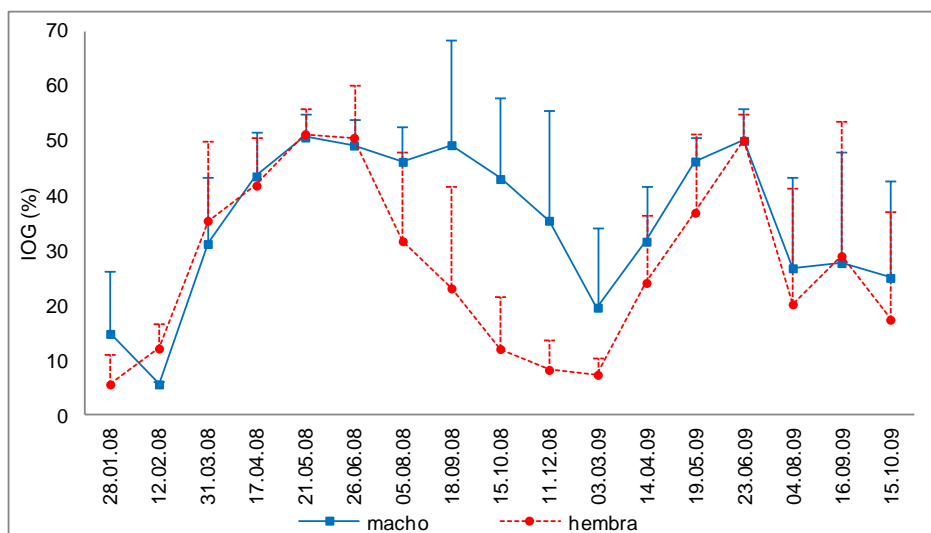


Figura 3.3. Evolución del Índice de Ocupación Gonadal para machos (dato medio + de) y hembras (dato medio + de) de *C. gigas* cultivados en la Ría de Arousa.

Los machos sufren una disminución del IOG no significativa ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) entre los meses de mayo y junio de 2008. Esta tendencia sigue en el siguiente mes (agosto), sin embargo en septiembre ocurre una rápida recuperación no significativa ($P > 0,005$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), seguida de una disminución no significativa ($P > 0,005$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) en los meses posteriores hasta alcanzar el valor mínimo del IOG en marzo de 2009 ($19,63 \pm 14,47\%$). En el segundo año de muestreo (2009) la evolución del IOG se diferencia del año anterior, alcanzando el máximo en junio ($50,02 \pm 5,81\%$), seguido de una disminución significativa ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) en agosto.

Analizando los resultados de 2008, se puede observar que en los machos los valores del IOG permanecen elevados hasta el último muestreo (diciembre), sin embargo con gran dispersión, lo que puede indicar la coexistencia de individuos maduros e individuos que ya hayan puesto.

Las hembras presentan una evolución distinta a los machos, con un aumento progresivo significativo ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) hasta el muestreo de mayo de 2008 y un

descenso significativo ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) entre finales de junio y principios de agosto de 2008. Posteriormente, los valores del IOG, siguen bajando hasta alcanzar el mínimo de $7,40 \pm 2,97\%$ en marzo de 2009. El segundo año de muestreo (2009) presentó una evolución similar, con un incremento significativo ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) de los valores hasta el muestreo de junio ($50,11 \pm 4,82\%$) y una disminución significativa ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) entre finales de junio y principios de agosto de 2009.

Al comparar la evolución del IOG entre machos y hembras, se observa, en 2008, una tendencia de aumento del IOG con valores significativamente ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) superiores en febrero en hembras y valores que no difieren significativamente ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) entre los meses de marzo y junio. En el muestreo de agosto de 2008 hay una disminución del IOG en ambos los sexos, sin embargo, en hembras, tal efecto es más acentuado, haciendo que haya una diferencia significativa ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney). En los siguientes muestreos de 2008, los valores del IOG son significativamente ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) superiores en machos.

En el año de 2009, a partir de abril, la evolución de los valores del IOG en ambos los sexos no presentan diferencia significativa ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) hasta el último muestreo.

3.3.4. Talla media de los ovocitos

Los ovocitos al principio de los muestreos (enero de 2008) presentaban una talla media de $8,01 \pm 2,56 \mu\text{m}$ y $7,50 \pm 2,33 \mu\text{m}$, cuando analizados todos los ovocitos y solo los que presentan vesícula germinal bien definida respectivamente, no habiendo diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA) entre ambas medidas (Figura 3.4). A partir de enero, los ovocitos incrementaron su talla media hasta el muestreo de junio de 2008, cuando evaluamos todos los ovocitos juntos y hasta agosto de 2008, cuando se analiza solamente los ovocitos con vesícula germinal bien definida. En estos dos muestreos se ha podido verificar una superioridad significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en los ovocitos con vesícula germinal.

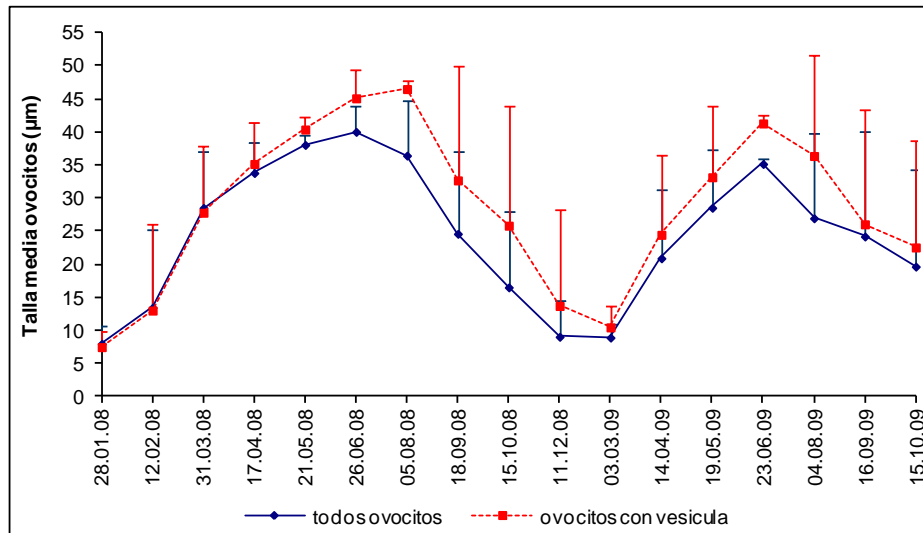


Figura 3.4. Evolución de la talla media de los ovocitos (dato medio + de) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa, evaluando todos los ovocitos y solamente los que presentaban vesícula germinal bien definida.

Alcanzado el momento de mayor acúmulo de reservas, los ovocitos están listos para ser liberados al medio natural, con la consiguiente disminución significativa ($P < 0,05$, Mann-Whitney) de su talla media entre junio y septiembre, si consideramos todos los ovocitos, y entre agosto y septiembre si sólo medimos los ovocitos con vesícula germinal bien definida.

Al principio del segundo año de muestreo (marzo de 2009) los ovocitos presentaban tallas medias de $8,94 \pm 1,91 \mu\text{m}$ y $10,49 \pm 3,17 \mu\text{m}$, según se midan todos o solo los que tienen vesícula respectivamente, no habiendo diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA). Los valores máximos de la talla media de los ovocitos en 2009, fueron observados en el muestreo de finales de junio con valores significativamente superiores en los ovocitos que presentaban vesícula germinal bien definida ($P < 0,05$, ANOVA, SNK).

Entre los meses de junio y agosto disminuye la talla de los dos tipos de ovocitos, aunque no de forma significativa ($P > 0,05$, Mann-Whitney).

3.3.5. Estadios de desarrollo gonadal

3.3.5.1. Machos

Los estadios de desarrollo gonadal en machos de *C. gigas* cultivados en la Ría de Arousa están ilustrados en la figura 3.5.

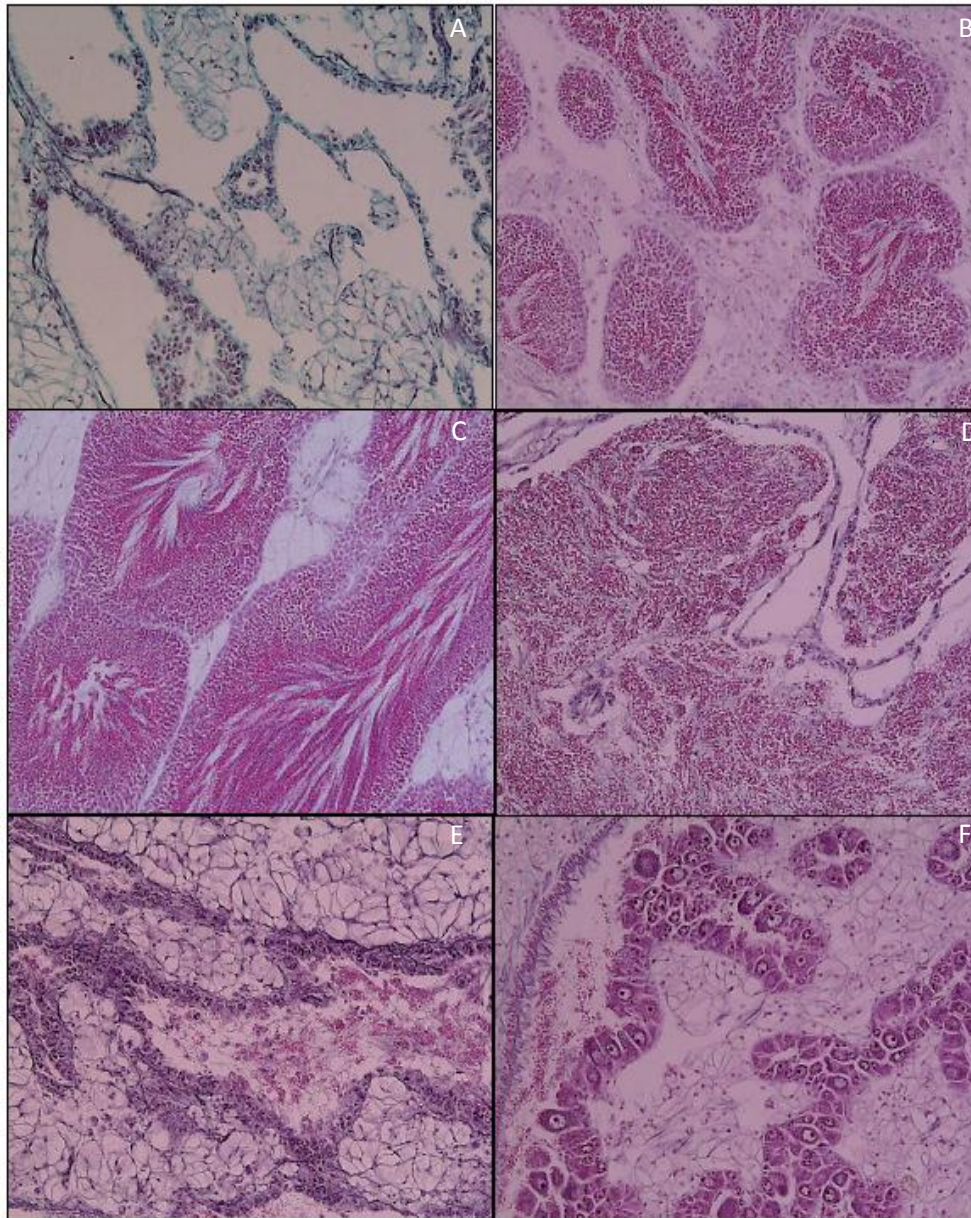


Figura 3.5. Estadios de desarrollo gonadal de machos de *C. gigas* cultivados en la Ría de Arousa. A: Estadio I. Multiplicación de espermatogônias. B: Estadio II. Gametogénesis. C: Estadio IIIA. Maduración. D: Estadio IIIB. Puesta. E: Estadio IIID. Fin de la estación de reproducción. F. Hermafrodita protándrico. Aumento de 200x.

En el caso de los machos no se observaron en las preparaciones histológicas individuos en el estadio 0 (reposo sexual) a lo largo del periodo estudiado. En el primer muestreo (enero de 2008) el 50% de los machos estaban en el estadio I (multiplicación de espermatogonias) y el otro 50% en el estadio II (gametogénesis) indicando el principio de un nuevo ciclo reproductivo.

El estadio II está presente en febrero con una proporción del 66,7%, lo que puede indicar una gran velocidad de desarrollo gonadal en machos, de manera que la mayoría de las ostras pasen rápidamente por este estadio y entren en el estadio IIIA. La proporción de

individuos en fase de maduración (estadio IIIA) alcanza el 100% de las ostras evaluadas en marzo de 2008, manteniendo valores elevados (90 y 70%) en los meses de abril y mayo de 2008, respectivamente. Paralelamente, empiezan las primeras emisiones de gametos, representadas por el estadio IIIB, presentando dos picos de porcentaje máximo, uno entre los muestreos de mayo y septiembre de 2008, con valores que no superan los 50%, y otro, con mayor intensidad, en los muestreos de octubre (85,7%) y diciembre (88,9%) de 2008. Individuos en el estadio IIID (fin de la estación de reproducción) se observaron entre los muestreos de octubre de 2008 y marzo de 2009 (Figura 3.6).

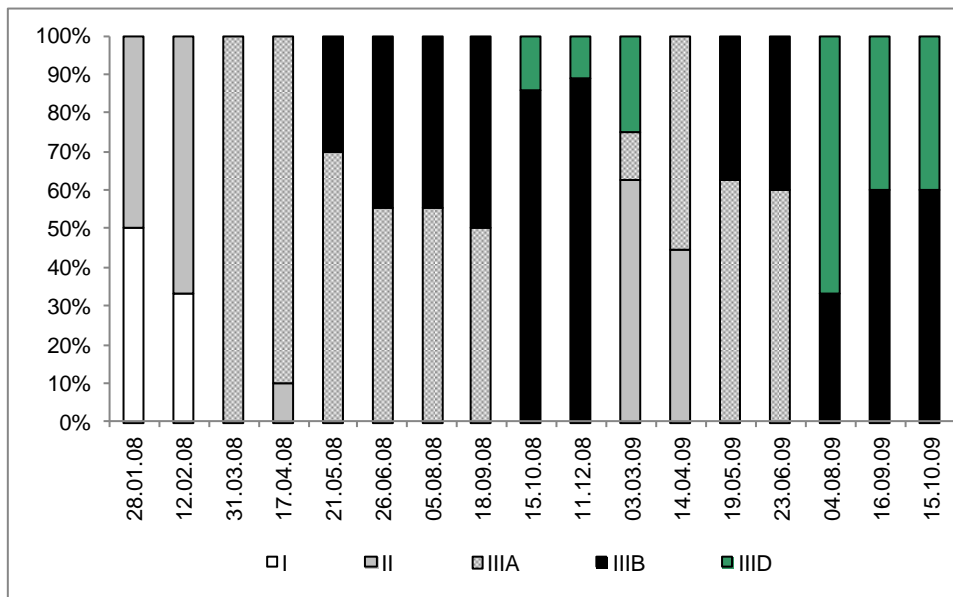


Figura 3.6. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para machos de *C. gigas*.

En el segundo año de muestreo las ostras siguen un desarrollo gonadal semejante al primer año, con la mayoría de los individuos maduros (IIIA) en abril y las primeras emisiones de gametos (estadio IIIB) al medio natural en mayo. Sin embargo, diferentemente al año anterior, la puesta masiva se adelanta para finales de junio a principios de agosto, como puede ser observado a través de la presencia, en agosto, del 33,3% en el estadio IIIB y del 66,7% en IIID. Esta situación de puesta se mantiene hasta el último muestreo.

3.3.5.2. Hembras

Los estadios de desarrollo gonadal en hembras de *C. gigas* cultivadas en la Ría de Arousa están ilustrados en la figura 3.7.

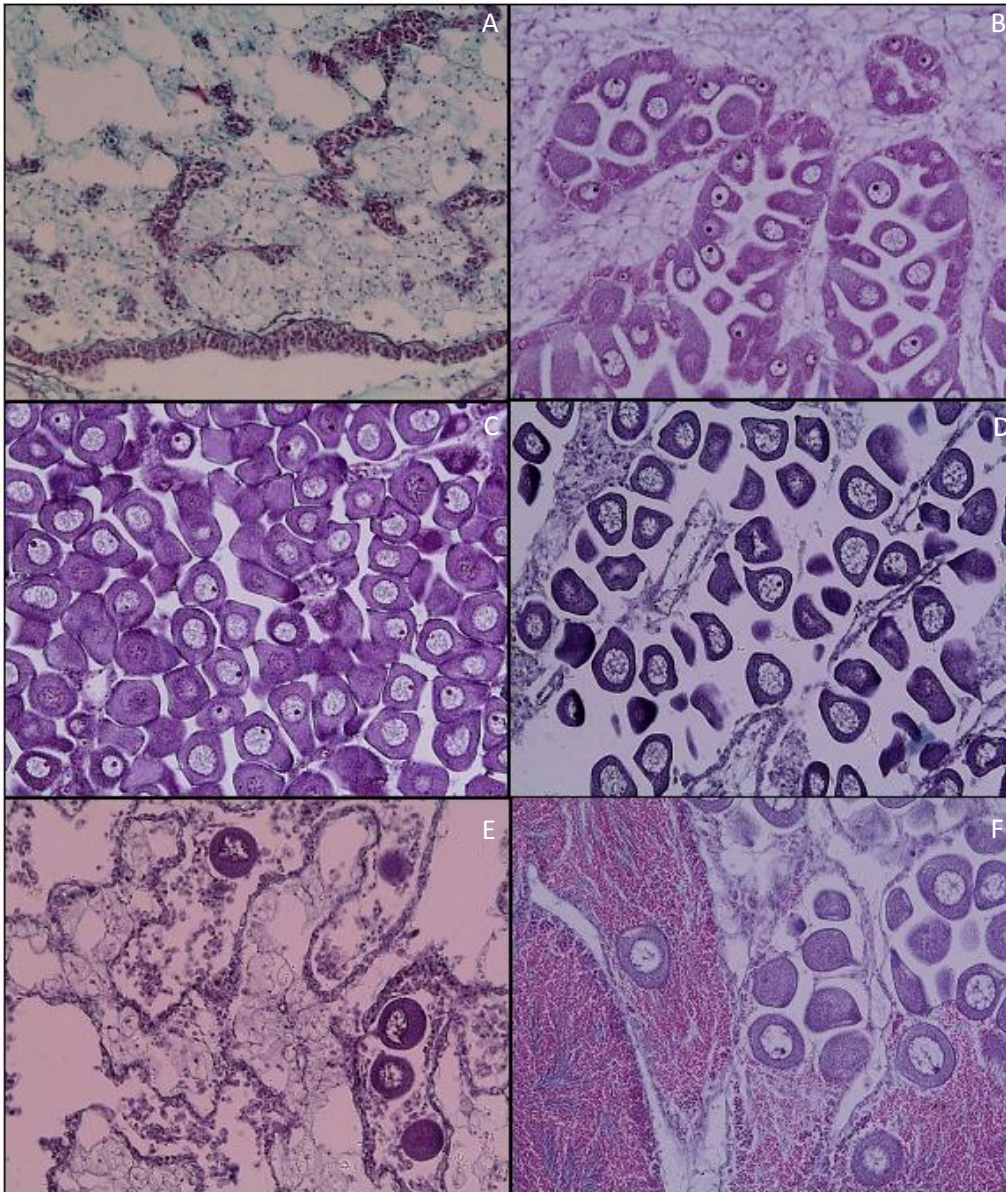


Figura 3.7. Estadios de desarrollo gonadal de hembras de *C. gigas* cultivadas en la Ría de Arousa. A: Estadio I. Multiplicación de ovogonias. B: Estadio II. Gametogénesis. C: Estadio IIIA. Maduración. D: Estadio IIIB. Puesta. E. Estadio IIID. Fin de la estación de reproducción. F. Hermafrodita protogínico. Aumento 200x.

La evolución de los estadios de desarrollo gonadal en hembras está representada en la figura 3.8. Como en los machos, el estadio 0 (reposo sexual) no fue observado a lo largo del periodo analizado en las preparaciones histológicas de hembras. En el muestreo inicial, el 75% de los individuos presentaban un estadio I (multiplicación de gonias) y un 25% un estadio II (gametogénesis), siendo la gametogénesis intensa en los dos muestreos siguientes (febrero y marzo de 2008), llegando a alcanzar un máximo del 75% de individuos en el estadio II en el mes de marzo. En este mismo mes, se observa un 16,7% de hembras en el estadio IIIA (maduración), incrementándose este porcentaje hasta el máximo de 100% en los muestreos de

mayo y junio de 2008. La puesta se da masivamente entre finales de junio y principios de agosto de 2008, alcanzando un pico del 72,7% de ostras en el estadio IIIB en el muestreo de agosto de 2008. El fin de la estación de reproducción, representado por el 50% de las ostras en el estadio IIID, es muy marcado en el muestreo de octubre.

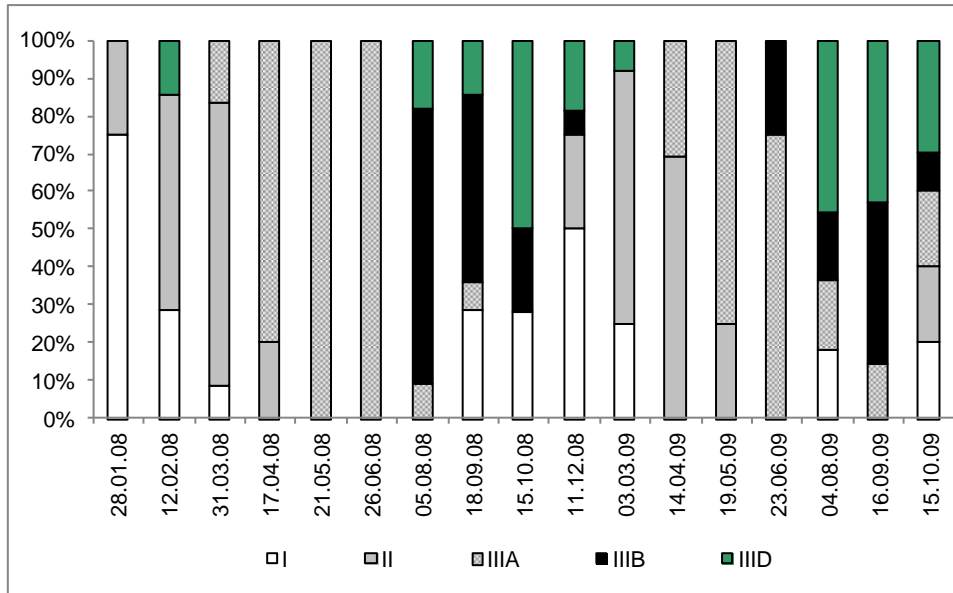


Figura 3.8. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para hembras de *C. gigas*.

Durante el segundo año de muestreo la maduración de las ostras sigue el mismo patrón del año anterior, sin embargo la presencia de hembras en el estadio II aun es observada en mayo de 2009. Igual que en los machos, la puesta es adelantada, y los primeros individuos en estadio IIIB son observados en finales de junio de 2009. Entre finales de junio y principios de agosto de 2009 ocurre una puesta masiva, observada a través de la presencia del 45,5% de ostras ya en el estadio IIID (fin de la estación reproductiva).

3.3.6. Variables ambientales

La evolución de la temperatura y clorofila *a* están representadas en la figura 3.9, donde se puede observar un ciclo estacional evidente para la temperatura, con un incremento a partir de la primavera alcanzando el máximo de 18,58 °C en 2008 y 19,91 °C en 2009, siendo ambos los valores registrados en el mes de julio. Posterior a este período, hay una disminución durante el otoño llegando al mínimo de 11,81 °C en 2008 y 13,55 °C en 2009.

La clorofila *a* ha presentado dos picos durante el año de 2008, uno en primavera (28/04) con 3,423 µg/l y el otro en otoño (22/09) con 3,103 µg/l. En el año de 2009, la evolución de la clorofila *a* fue distinta al año anterior, presentando valores elevados en finales de invierno, con

1,93 µg/l en 16/03 y durante toda la primavera. En principios del otoño (28/09) se ha observado, como en el año anterior, un pico con 2,76 µg/l de clorofila *a*.

La salinidad ha sido muy constante durante todo el periodo de estudio, presentando un valor medio de $34,55 \pm 1,30\text{‰}$.

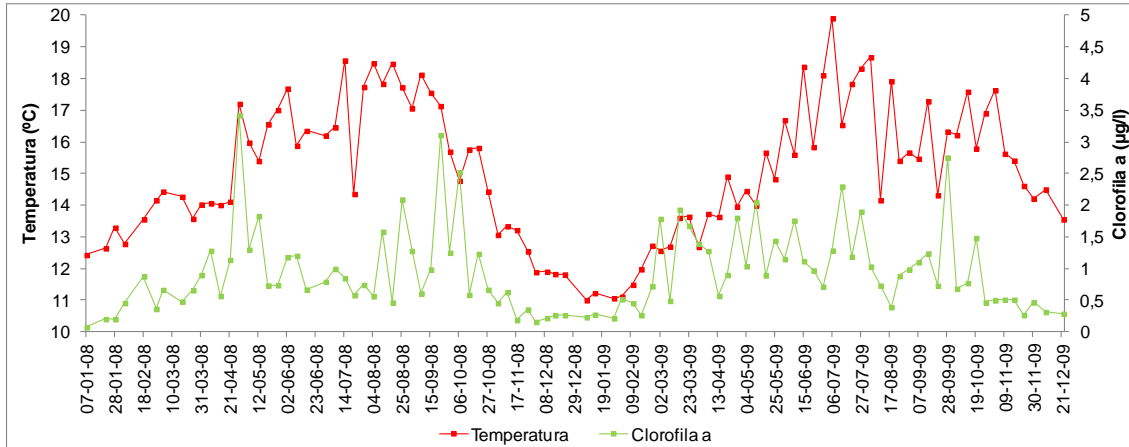


Figura 3.9. Evolución de los valores de temperatura y clorofila *a* en el Polígono A7 de O Grove, Ría de Arousa, durante el periodo de estudio.

3.3.7. Relación entre los factores ambientales y el IOG e IC

Los datos del índice de ocupación gonadal (IOG) en machos y hembras estuvieron más relacionados con la temperatura y con la clorofila *a* como se puede visualizar en la tabla 3.4, la cual presenta los valores de los coeficientes de correlación de Pearson. A través de la realización del análisis de regresión múltiple se ha podido verificar una moderada explicación de la variación del IOG en machos y en hembras cuando se utilizó un modelo incluyendo los datos de temperatura y clorofila *a* obteniendo valores del r^2 de 0,39 para machos y 0,35 para hembras. Sin embargo, cuando se evaluó a través del análisis de regresión múltiple la influencia de la temperatura y de la clorofila *a* durante el período de maduración (enero a junio en el primer año y marzo a junio en el segundo año) se ha podido verificar valores de r^2 superiores a 0,80, como está representado en la tabla 3.5.

Tabla 3.4. Coeficientes obtenidos en el análisis de correlación de Pearson entre el IOG e IC, y las variables ambientales (temperatura, salinidad y concentración de clorofila *a*) y valores de r^2 obtenidos en el análisis de regresión múltiple entre el IOG e IC, y la temperatura y clorofila *a* durante todo el período de estudio.

	Temperatura	Salinidad	Clorofila <i>a</i>	r^2
IOG macho	0,58	-0,08	0,49	0,39
IOG hembra	0,57	-0,19	0,42	0,35
IC macho	0,52	-0,21	0,26	0,27
IC hembra	0,48	-0,36	0,15	0,24

Los datos del índice de condición (IC) en machos y en hembras tuvieron una correlación positiva con la temperatura y valores bajos para la correlación con la clorofila *a* durante todo el período de estudio (Tabla 3.4). El análisis de regresión múltiple, para todo el período de estudio, utilizando como variables independientes (explicativas) la temperatura y clorofila *a*, presentó valores de r^2 de 0,27 para machos y 0,24 para hembras. Sin embargo, cuando se realizó la regresión múltiple para el período de maduración se ha podido observar valores elevados de r^2 , especialmente para el segundo año de muestreo (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Coeficientes obtenidos en el análisis de correlación de Pearson entre el IOG e IC, y las variables ambientales (temperatura, salinidad y concentración de clorofila *a*) y valores de r^2 obtenidos en el análisis de regresión múltiple entre el IOG e IC, y la temperatura y clorofila *a* durante el período de maduración.

	Temperatura	Salinidad	Clorofila <i>a</i>	r^2
IOG macho (1° año)	0,84	-0,04	0,80	0,80
IOG macho (2° año)	0,89	-0,76	0,70	0,80
IOG hembra (1° año)	0,94	-0,21	0,78	0,92
IOG hembra (2° año)	0,95	0,72	-0,62	0,92
IC macho (1° año)	0,70	-0,57	0,51	0,49
IC macho (2° año)	0,99	0,78	-0,60	0,98
IC hembra (1° año)	0,88	-0,51	0,68	0,79
IC hembra (2° año)	0,98	0,80	-0,57	0,97

3.4. DISCUSIÓN

La ostra japonesa *Crassostrea gigas*, introducida en Galicia a principios de los años 90 como una alternativa al cultivo de la ostra plana *Ostrea edulis*, es una de las especies de moluscos bivalvos más estudiadas en el mundo; sin embargo son escasos los trabajos relacionados con la reproducción de esta especie en Galicia, siendo este el primero en analizar cualitativamente y cuantitativamente el desarrollo gonadal de *C. gigas* introducida en la Ría de Arousa a través de semillas importadas de Francia.

Barber y Blake (1991) apuntan la necesidad del uso de métodos cuantitativos y cualitativos para el estudio del desarrollo gonadal en bivalvos, siendo la histología necesaria para describir los eventos reproductivos relacionados con el desarrollo gametogénico y las técnicas cuantitativas, como el IC, el IOG y la talla media de los ovocitos utilizados en el presente trabajo, importantes por eliminar la subjetividad y los problemas semánticos asociados a la descripción basada en estadios de desarrollo gonadal.

El Índice de Condición es un parámetro útil para reconocer el estatus nutritivo de los bivalvos y puede ser utilizado en la observación de cambios temporales en las reservas nutritivas, en la indicación de variaciones en la calidad de diferentes poblaciones de organismos, o en la observación de contaminantes y enfermedades (Crosby y Gale, 1990). El IC es también considerado el método más simple y práctico para evaluar el desarrollo gonadal en bivalvos (Okumus y Stirling, 1998) y es frecuentemente utilizado en trabajos con *C. gigas* (Bodoy *et al.*, 1986; Mason y Nell, 1995; Steele y Mulcahy, 1999; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Royer *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Chávez-Villalba *et al.*, 2010). En el presente trabajo se encontraron valores del IC que no presentaban diferencias significativas entre los sexos durante todo el periodo de estudio, con excepción del mes de diciembre de 2008, lo que coincide con lo obtenido por Baghurst y Mitchell (2002) en esta especie en el Sur de Australia, los cuales no encontraron diferencias significativas entre machos y hembras durante todo su periodo de estudio.

A través del análisis del IC del primer año del estudio, se ha podido establecer que en machos de *C. gigas* la liberación de gametos se produce antes que en las hembras, como se pone de manifiesto por la disminución del valor del IC a finales de mayo y principios de junio, mientras las hembras empezarían la puesta en julio, habiendo posteriormente una rápida recuperación en ambos los sexos en finales del verano y un posible segundo periodo de puesta entre finales de septiembre y principios de octubre. En el caso de los machos, este segundo periodo de puesta se prolongaría hasta diciembre. Sin embargo, en el segundo año, la evaluación del IC no fue sensible para verificar las variaciones en machos, presentando en los mismos, valores elevados pero con gran dispersión hasta septiembre, seguido de una disminución significativa. Normand (2008) evaluando el IC de *Crassostrea gigas* cultivada en Francia,

establece la existencia de un único periodo de puesta entre finales de julio e inicio de agosto, sin hacer referencia a diferencias entre los sexos.

Delgado y Pérez Camacho (2003) indican que el uso de métodos que miden el área ocupada por los gametos, como el Índice de Ocupación Gonadal, proporcionan una determinación más objetiva del grado de madurez sexual. Los datos del IOG obtenidos en el presente trabajo, confirman los resultados obtenidos con el análisis del IC en lo que se refiere a las épocas de puesta del primer año en ambos los sexos y del segundo año en hembras. Sin embargo, este índice nos aportan más informaciones que no han podido ser visualizadas con el uso del IC, donde los machos presentan una gran superioridad significativa de la proporción de gametos presentes en área gonadal durante todo el período posterior al primer pico de puesta de 2008 (junio-julio), lo que puede indicar una coexistencia de individuos maduros y en periodo de puesta hasta finales de diciembre, y en el segundo año, los datos del IOG presentan una disminución significativa en machos entre finales de junio y principios de agosto, lo que puede indicar el período de puesta no verificado por la evaluación del IC. Con esto, se puede verificar que el uso del IC como único medio de análisis cuantitativo del desarrollo gonadal lleva a conclusiones equivocadas con relación a las épocas de puesta siendo necesario el uso de otros métodos cuantitativos y/o cualitativos como complemento.

En el presente trabajo se ha hecho un comparativo de las mediciones de ovocitos utilizando todos los ovocitos y solamente los que presentaban vesícula germinal bien definida y se ha podido verificar que estos últimos presentan valores superiores durante todo el periodo de estudio. Sin embargo, los dos métodos de medición presentan una evolución semejante con valores máximos en finales de junio y una gran disminución en los meses siguientes, alcanzando valores mínimos en invierno. Con esto, se puede concluir que los dos métodos utilizados son aptos para describir la evolución de la talla media de ovocitos de ostras, lo que está en desacuerdo con varios autores que solamente indican la utilización de ovocitos con vesícula germinal bien definida (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Meneghetti *et al.*, 2004; Williams y Babcock, 2004; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Normand *et al.*, 2008).

A este respecto, es preciso considerar que, dada la evidente correlación negativa entre el tamaño del ovocito y la probabilidad de que aparezca su vesícula germinal en un corte histológico, la técnica que mide todos los ovocitos es más representativa de la situación real de la gónada, frente a la que sólo mide los ovocitos en los que se puede ver la vesícula germinal, pues está última técnica sobrevalora el porcentaje de ovocitos pequeños (menos desarrollados), al no considerar una buena parte de ovocitos grandes en los que el corte histológico no pasa por la vesícula germinal.

El análisis histológico, basado en los estadios de desarrollo gonadal descritos por Lubet (1959), y los resultados obtenidos con el IC y el IOG, indican que los machos en el primer año, presentan puestas parciales durante el período de mayo hasta diciembre con dos picos, uno entre

mayo y septiembre y otro entre octubre y diciembre, siendo el segundo pico más pronunciado. En el segundo año los machos empiezan el período de puesta en mayo y adelantan para finales de junio la puesta masiva. Con relación a las hembras, los resultados obtenidos a través del análisis histológico apuntan en el primer año un período de puesta comprendido entre el mes de julio y octubre y en el segundo año entre finales de junio y principios de agosto, ambos los años con una única puesta masiva.

Los resultados del análisis histológico en hembras divergen a los encontrados a través del uso del IC en lo que se refiere al segundo pico de puesta de 2008, de manera que la disminución encontrada a través del IC en el muestreo de octubre debe de estar relacionada con el aumento del porcentaje de individuos en fin de la estación de reproducción (estadio IIID) y no con un segundo pico de puesta. En los machos en 2009, los resultados del análisis histológico también divergen a los evaluados por el IC, donde en este análisis se puede verificar un incremento continuo hasta septiembre, sin embargo los datos del análisis histológico apuntan el comienzo de la liberación de los gametos en mayo. Estos resultados refuerzan la importancia y necesidad del uso de la histología como complemento a los métodos cuantitativos y viceversa.

La ostra japonesa *C. gigas* normalmente presenta un único período de puesta en Europa. En Francia, Berthelin *et al.* (2001) estudiando el ciclo reproductivo de dos poblaciones de *C. gigas* encuentran un único período de puesta en julio, la misma conclusión a que han llegado Lango-Reynoso *et al.* (2000) estudiando tres poblaciones en la costa Atlántica francesa. En Irlanda, Steele y Mulcahy (1999) encuentran para esta misma especie un único período de puesta entre agosto y septiembre. Sin embargo, en España, Ruiz *et al.* (1992) describen dos picos de puesta para la misma especie, sin hacer referencia a las diferencias entre sexos, mientras que en el presente estudio se han verificado diferencias entre machos y hembras con relación a la época de puesta. Resultados similares fueron encontrados por Dridi *et al.* (2007) con ostras cultivadas en Túnez, con picos de puesta en junio y septiembre.

Fabioux *et al.* (2005) apuntan que de una manera general, *C. gigas* exhibe un ciclo reproductivo estacional claramente relacionado con la temperatura, de manera que el inicio de la gametogénesis se produciría en invierno cuando la temperatura del agua es baja, seguido de una fase de gametogénesis intensa en primavera, maduración y puesta en verano y un período de reabsorción en otoño. Cuando se analizan los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos verificar que las ostras cultivadas en la Ría de Arousa siempre están en proceso de gametogénesis, una vez que la temperatura del agua nunca llega a registrar valores inferiores a los 10 °C. Esta afirmación está apoyada por los resultados obtenidos a través de las observaciones histológicas, que muestran la ausencia de individuos en reposo sexual, estadio 0 de desarrollo, durante todo el periodo de estudio, de manera que las ostras pasan de un estadio IIID (fin de la estación de reproducción) a un estadio I (gametogénesis).

Ruiz *et al.* (1992) indican que existe un umbral de 16 °C que es necesario alcanzar para la maduración de *C. gigas*, sin embargo los resultados del presente trabajo muestran un porcentaje de individuos maduros del 100% en machos en marzo de 2008 y 80% en hembras en abril del mismo año, aún cuando las temperaturas máximas observadas hasta el momento no habían alcanzado los 14,5 °C. En el segundo año de estudio también se encuentran individuos maduros con temperaturas inferiores a los 14 °C. Con estos resultados se puede afirmar que las ostras pueden madurar a temperaturas inferiores a los 14 °C. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Fabioux *et al.* (2005) que obtuvieron ostras maduras con temperaturas entre 8-10 °C.

Muchos autores apuntan la temperatura como el principal factor inductor de la puesta (Sastry, 1975; Deslous-Paoli *et al.*, 1982; Muranaka y Lannan, 1984; Thompson *et al.*, 1996). En *C. gigas*, Mann (1979) realizando maduración a diferentes temperaturas, sugiere un umbral de 18 °C para que sea inducida la puesta, siendo esta temperatura superior a la necesaria para estimular la gametogénesis. En el presente estudio, esta temperatura solamente ha sido alcanzada durante los meses de julio a septiembre, sin embargo, las observaciones histológicas muestran la existencia de puesta en machos en finales de mayo en ambos los años, aún cuando las temperaturas no alcanzaban los 17 °C y 16 °C, en 2008 y 2009 respectivamente. Con eso se puede proponer que los machos empiezan la puesta en temperaturas superiores a los 15 °C. Las hembras presentan una puesta masiva a partir de julio cuando las temperaturas están por encima de los 18 °C, estando estos resultados en acuerdo con lo descrito por Mann (1979).

La habilidad de *C. gigas* para responder a la presencia de blooms estacionales de fitoplancton había sido descrita por Lubet (1976) y Lubet y Mann (1987) y estaría en concordancia con la hipótesis de que el fitoplancton disponible en el medio podría inducir a la puesta propuesta por Ruiz *et al.* (1992). En el presente trabajo, los machos presentan un segundo periodo de puesta en otoño, lo cual parece no estar relacionado principalmente con la temperatura y si con el alimento disponible en el medio. Estos resultados están fuertemente relacionados con las características ambientales presentes en la Ría de Arousa, donde un segundo bloom fitoplanctónico (3,10 µg/l de clorofila *a* en 22/09/08 y 2,76 µg/l de clorofila *a* en 28/09/09) durante el otoño sería el principal factor estimulante de la puesta de los machos durante los meses de octubre y diciembre

El porcentaje de hembras (42,01%) fue significativamente inferior a los machos (50,19%), resultado que concuerda con el obtenido por Baghurst y Mitchell (2002) y Guo *et al.* (1998) los cuales encontraron un porcentaje de hembras de 39,1 y 37,5% para ostras de dos años, respectivamente. Sin embargo, diversos autores encontraron que durante el inicio de la gametogénesis la proporción de hembras es superior (Ruiz *et al.*, 1992; Steele y Mulcahy, 1999; Berthelin *et al.*, 2001), resultados que divergen a los encontrados en el presente trabajo, que demuestra una mayor presencia de machos en los muestreos de marzo de ambos los años. Este

facto podría explicarse por una mayor precocidad en la maduración de los machos, lo que está apoyado por los resultados obtenidos a través del análisis de los estadios de desarrollo gonadal, el cual apunta un 100% de machos maduros en marzo del primer año y un 12,5% en el segundo año de muestreo.

La proporción sexual sufre un cambio significativo en el mes de mayo de 2008, momento del año con mayor IC y que coincide con la mayor concentración de clorofila *a* y temperatura elevada, existiendo una predominancia de hembras. Estos resultados muestran la gran plasticidad con relación a los cambios de sexo de esta especie en relación a las variables ambientales.

3.5. CONCLUSIONES

- El uso del IC como único medio de análisis del desarrollo gonadal lleva a conclusiones equivocadas con relación a las épocas de puesta siendo necesario el uso de la histología como complemento a los métodos cuantitativos y viceversa.
- Las ostras cultivadas en la Ría de Arousa siempre están en proceso de gametogénesis no entrando en periodo de reposo sexual (estadio 0).
- La temperatura y la clorofila *a* están directamente relacionadas con la maduración, pudiendo las ostras cultivadas en la Ría de Arousa madurar a temperaturas inferiores a los 14 °C.
- Los machos presentan puestas parciales durante el período de mayo hasta diciembre con dos picos, uno en primavera y el otro en otoño, siendo el segundo pico más pronunciado, mientras las hembras presentan un período de puesta comprendido entre el mes de julio y octubre, con una única puesta masiva.
- El primero pico de puesta está relacionado tanto con las temperaturas elevadas así como con las altas concentraciones de clorofila *a* presente en el medio, mientras el segundo pico de puesta de los machos en otoño, está relacionado principalmente con el alimento disponible en el medio.
- La temperatura necesaria para la inducción a la puesta es distinta entre los sexos, siendo necesaria una temperatura superior a los 15 °C para la inducción en machos y 18 °C para la inducción en hembras.
- La talla media de los ovocitos sigue un ciclo semejante al IOG, con valores máximos en primavera y verano y mínimo en invierno.
- Los dos métodos utilizados para la medición de la talla media de los ovocitos son aptos para describir su evolución, sin embargo es preciso considerar que, dada la evidente correlación negativa entre el tamaño del ovocito y la probabilidad de que aparezca su vesícula germinal en un corte histológico, la técnica que mide todos los ovocitos es más representativa de la situación real de la gónada.
- El porcentaje de hembras fue significativamente inferior a los machos durante el periodo de estudio, con excepción del mes de mayo de 2008, momento del año con mayor IC y que coincide con la mayor concentración de clorofila *a* y temperatura elevada.

**4. EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA
GENERAL DE *Crassostrea gigas* EN RELACIÓN AL CICLO
REPRODUCTIVO EN LA RÍA DE AROUSA**

EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA GENERAL DE *Crassostrea gigas* EN RELACIÓN AL CICLO REPRODUCTIVO EN LA RÍA DE AROUSA

4.1. INTRODUCCIÓN

La especie *Crassostrea gigas*, nativa del sudeste asiático, incluyendo el mar del Japón, China y Corea, conocida como ostra del pacífico o japonesa, presenta datos de producción en España desde el año 1964, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2013a). Sin embargo, su introducción en Galicia fue liberada solo en 1991, cuando el gobierno autonómico autorizó su cultivo experimental en bateas con el fin de valorar la viabilidad del cultivo de esta especie desde un punto de vista productivo, pero también ecológico (Xunta de Galicia, 1992).

En los primeros cultivos realizados, se ha podido verificar una mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), de cultivo tradicional y autóctona de esta zona (Fernández *et al.*, 2002). Estos resultados implican la necesidad de estudios más detallados acerca de la biología y cultivo de esta especie bajo las características ambientales en las costas españolas, con especial énfasis en las zonas de producción gallegas.

La evolución estacional de los componentes bioquímicos en *C.gigas* ha sido estudiada en diversos países (Linehan *et al.*, 1999; Massapina *et al.*, 1999; Berthelin *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003; Dridi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Pogoda *et al.*, 2013). Sin embargo, en España los estudios sobre la composición bioquímica de la ostra japonesa son muy escasos (Ruiz *et al.*, 1992a; Pazos *et al.*, 1996) y no contemplan el análisis individualizado de machos y hembras. En la especie, objeto de nuestro estudio, *C. gigas*, hasta la fecha no se ha elaborado ningún estudio detallado en este sentido en España.

De una manera general, el patrón seguido por cada uno de los componentes está íntimamente ligado al estado de madurez sexual del animal y al suministro energético, soportado por el aporte directo de nutrientes como también por la utilización de las reservas previamente almacenadas, existiendo una clara relación entre ambos factores (Navarro *et al.*, 1989). La naturaleza de las reservas y del compartimiento de almacenamiento depende de la especie de bivalvo. Del mismo modo, dentro de la misma especie, los periodos de utilización de las reservas pueden desplazarse dependiendo del local, una vez que las etapas del ciclo de vida están relacionadas a los factores ambientales (Bayne, 1976; Fabioux *et al.*, 2005).

Basándose en la relación entre el desarrollo gonadal y la acumulación y utilización de nutrientes, las especies pueden ser clasificadas como conservativas u oportunistas (Bayne, 1976). En las especies conservativas la gametogénesis ocurre en otoño-invierno a expensas de

las reservas previamente adquiridas en verano, mientras que en las oportunistas la gametogénesis ocurre en primavera cuando existe una abundancia de alimento en el medio, produciéndose el desarrollo gametogénico paralelo a la acumulación de reservas. Ambas estrategias reproductivas pueden considerarse adaptaciones a las condiciones ambientales en las que vive el animal, encontrándose especies con estrategias intermedias que utilizan tanto las reservas almacenadas como el alimento disponible en el medio natural (Sastry, 1979).

En los bivalvos marinos, las reservas energéticas están esencialmente constituidas por carbohidratos y en especial el glucógeno (Mathieu y Lubet, 1993). Esto ha sido demostrado por la correlación negativa entre el índice de condición y el contenido de carbohidratos en muchas especies. En la mayoría de los bivalvos marinos, el glucógeno tiene un papel central en el soporte energético del metabolismo de mantenimiento y en la gametogénesis (Bayne *et al.*, 1982; Ruiz *et al.*, 1992a).

Otro componente con un importante papel como reserva energética son los lípidos, dado su alto contenido calórico, además de constituir un componente de gran importancia en los ovocitos de los bivalvos (Holland, 1978; Gabbott, 1983). También ha sido descrito que los lípidos aportan energía durante el crecimiento de invierno, cuando los carbohidratos ya fueron consumidos (Beninger y Lucas, 1984).

Por otra parte, el uso de las proteínas como fuente de energía parece producirse sólo cuando las reservas de carbohidratos han sido ampliamente reducidas (Barber y Blake, 1981; Larretxea, 1995; Pérez-Camacho *et al.*, 2003), estando por lo tanto sujetas a transformaciones metabólicas, pero no sometidas a importantes procesos de acumulación como lípidos o carbohidratos (Gabbott, 1976).

Evaluar la acumulación y movilización de reservas bioquímicas en ostras *Crassostrea gigas* cultivadas en batea en la Ría de Arousa durante dos ciclos reproductivos consecutivos es el objetivo de este capítulo, además de evaluar la influencia de la diferenciación sexual en la composición bioquímica general (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos).

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Área de estudio y muestreo

El estudio de la evolución de la composición bioquímica general se llevó a cabo con ostras de dieciséis meses cultivadas en una batea situada en el Polígono A7 de O Grove en la Ría de Arousa (42° 30' 30" N, 8° 51' 54" W). Estas ostras habían sido importadas de Francia en abril de 2007, con aproximadamente 7 meses de vida. Las ostras estaban siendo cultivadas en jaulas patentadas por el IEO en una densidad de aproximadamente 40 ostras por cesta.

Para este estudio, se recogieron muestras de 20 ostras con intervalos de aproximadamente un mes, durante el período de enero de 2008 hasta octubre de 2009. Una vez recogidas, las ostras fueron conducidas hasta el Centro Oceanográfico da Coruña del Instituto Español de Oceanografía (IEO), donde se realizaron los muestreos. En estos muestreos, cada ostra fue medida (longitud y anchura) con un calibre con una precisión de 0,1 mm y pesada (peso total y peso fresco de las partes blandas) utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Tras ser medidos y pesados, se realizó la determinación sexual mediante un frotis. A continuación se liofilizaron las partes blandas de 10 ostras (5 machos y 5 hembras) durante 48 h en un liofilizador, anotándose el peso seco de los organismos. Las muestras fueron mantenidas a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

4.2.2. Composición bioquímica general

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica (%MO), cada muestra fue pulverizada en un mortero de porcelana y el contenido inorgánico se obtuvo por calcinación a 450 °C de partes alícuotas (aproximadamente 20 miligramos).

Para la determinación de los componentes bioquímicos generales (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos) se tomaron 20 mg del tejido liofilizado de cada ostra y se homogenizaron en 1000 µL de agua destilada, preparándose estos extractos crudos iniciales para los análisis bioquímicos.

4.2.2.1. Proteínas

Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951). En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 50 µL del extracto crudo, el cual se diluyó en 150 µL de ácido tricloroacético al 20% a 4 °C (TCA) (Panreac ref. 131067.1609) y se dejó reposar por 10 minutos a 4 °C. A continuación se centrifugaron las muestras (10000xg, 4 °C, 10 minutos) concentrándola en 10 µL. El sobrenadante obtenido de la centrifugación (190

μL) fue la base para los análisis de carbohidratos y glucógeno. Al sedimento de 10 μL se le añaden 300 μL de NaOH 1M (Panreac ref. 131687), y se incuba a 56 °C por 30 minutos, agitándose en vortex a cada 5 minutos. A continuación se llenan las microplacas con 30 μL de la muestra y del estándar y se les agregan 20 μL de la solución BIORAD Protein Assay Reagent A (Ref. 500-0113) y 300 μL de la solución BIORAD Protein Assay Reagent B (Ref. 500-0114). La absorbancia se determinó a 630 nm con un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de albúmina sérica bovina (BSA Fracción V – Sigma A7906-50G), con concentraciones en el intervalo de 0 a 900 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2.2.2. Carbohidratos totales

Los carbohidratos se cuantificaron como glucosa por el método del fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). De este modo, se valoraron tanto los monosacáridos de la muestra como los obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de los polisacáridos. En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 50 μL del sobrenadante de las proteínas y se les añadieron 200 μL de solución de Fenol al 5,4% (Panreac ref. 141323) y 1000 μL de ácido sulfúrico puro $d=1,84$ (Fluka 95-97% ref. 84719), dejando en seguida la muestra enfriar por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 490 nm con un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de glucosa, con concentraciones en el intervalo de 0 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2.2.3. Glucógeno

El glucógeno se cuantificó por el método del fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956) modificado. En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 50 μL del sobrenadante de las proteínas y se les añadieron 100 μL de etanol al 100% a 4 °C (manteniendo una proporción de 2:1 etanol:muestra), agitándose en un vortex. A continuación se dejó reposar la muestra en hielo por 15 minutos seguido de una centrifugación (1883xg, 4 °C, 20 minutos). Los 100 μL del sobrenadante son descartados y se mantiene sólo los 50 μL donde está precipitado el glucógeno. Sobre el precipitado se le adiciona 200 μL de solución de Fenol al 5,4% (Panreac ref. 141323) y 1000 μL de ácido sulfúrico puro $d=1,84$ (Fluka 95-97% ref. 84719), dejando en seguida la muestra a enfriar de 30 a 60 minutos en temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 490 nm con un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de glucosa, con concentraciones en el intervalo de 0 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2.2.4. Lípidos totales

Los lípidos totales se cuantificaron de acuerdo al método de sulfo-fosfovainillina para lípidos totales según Zöllner y Kirsh (1962), utilizando el colesterol como estándar. Los lípidos séricos incluyendo el colesterol, forman con el ácido sulfúrico un ion de carbono que reacciona con la fosfovainillina produciendo un complejo de color violeta cuya intensidad se mide colorimétricamente.

En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se depositaron 100 μl del extracto crudo inicial, luego a cada tubo se le agregaron 1000 μl de cloroformo:metanol (2:1) a 4 °C agitándose en vortex. Las muestras se dejaron reposar por 15 minutos en temperatura ambiente. Luego los microtubos fueron centrifugados (8000xg, 4 °C, 20 min). Posteriormente, se traspasaron 200 μl de la fase inferior, conteniendo los lípidos, a un nuevo set de microtubos rotulados, dejando que se evapore el solvente con las tapas abiertas a 56 °C por 120 minutos. El estándar (3 mg de colesterol. ml^{-1} de cloroformo:metanol (2:1)) se diluyó para preparar la solución de trabajo: 150 mg de colesterol se diluyeron en 50 ml de cloroformo:metanol a 4 °C, luego se procedió a realizar la curva de calibración por duplicado. El preparado de la curva de calibración se dejó evaporar al igual que las muestras. Una vez evaporadas las muestras y la curva de calibración, se procedió a resuspender los lípidos en 200 μl de ácido sulfúrico puro $d=1.84$ (Fluka 95-97% ref. 84719) agitándose en vortex. Inmediatamente después, las muestras con el ácido se calentaron a 90 °C durante 10 minutos con las tapas cerradas. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agitó en un vortex, llevando 20 μl en duplicado a las microplacas. Por último se agregaron 300 μl de la solución de vainillina (100 ml de agua destilada + 400 ml de ácido ortofosfórico + 1 g vainillina (Panreac ref. 142048)) a la microplaca 1 y 300 μl de ácido ortofosfórico a la microplaca 2 y se mantuvieron en oscuridad por 40 minutos en temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de colesterol, con concentraciones en el intervalo de 0 a 175 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. La concentración de lípidos en las muestras es calculada disminuyendo el valor obtenido de la placa 1 por el valor obtenido de la placa 2.

4.2.3. Variables ambientales

Los datos de temperatura y salinidad en la columna de agua a una profundidad de 0-5 metros, fueron obtenidos, por una sonda CTD Sea-Bird 25. Los datos de clorofila *a* fueron obtenidos por el filtrado a presión constante de un volumen de 100 mL de agua a una profundidad de 0-5 metros, separando las partículas en dos clases $>2,7\mu\text{m}$ y $<2,7\mu\text{m}$, las cuales fueron sumadas para representar el dato de clorofila *a*. La extracción de la clorofila *a* presente en los filtros de fibra de vidrio realizase con acetona al 90% refrigerada y en oscuridad por no

menos que 14 horas. Posteriormente se analizan por espectrofotometría por medio de una ecuación tricromática, siguiendo el método de Neveux y Panouse (1987). Todos los datos fueron obtenidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia, en una estación meteorológica ubicada cerca de la batea de cultivo en el polígono A7 de O Grove. Estos datos fueron proporcionados por el INTECMAR en el marco de un convenio entre éste y el IEO para la toma de datos oceanográficos en las Rías Gallegas.

4.2.4. Presentación de los datos y análisis estadístico

Los datos mostrados en las tablas se corresponden con la media total y la desviación estándar de los individuos analizados en cada muestreo. Los valores de los diferentes componentes están expresados en contenido absoluto libre de cenizas (mg.ind^{-1}) y en porcentaje de materia orgánica (%MO). Todos los componentes están estandarizados a la talla media de todo el periodo de muestreo (90,1 mm de longitud). Esta forma de proceder ha sido recomendada por Beninger y Lucas (1984) por dos motivos fundamentales: primero, evita el solapamiento o interferencia entre las variaciones estacionales y las que se deben al crecimiento, y segundo, contrarresta la posibilidad de que las fuertes oscilaciones de un determinado compuesto enmascaren la variación de otros.

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Plus 5.1. Para todos los datos se analizó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, cuando presentaban el mismo número de datos, y de Bartlett cuando presentaban un número distinto. Cuando los datos son normales y las varianzas homogéneas se realizó el Análisis de Varianza Simple (ANOVA) y en los casos en que los datos no se adecuaban a la distribución normal o las varianzas no fueran homogéneas se empleó la transformación logarítmica para garantizar su homogeneidad. Los datos relativos al porcentaje de materia orgánica fueron transformados mediante la transformación angular ($\arcsen \sqrt{\%}$). Para los tests a posteriori se utilizaron el test de Student-Newman-Keuls (SNK). En todos los casos se utilizó un α de 5%.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Resumen del ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de *C. gigas* cultivada en batea en la Ría de Arousa está detallado en el capítulo 3, sin embargo con la intención de facilitar el entendimiento de la relación de la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas con el ciclo reproductivo, haremos un resumen de los principales resultados obtenidos.

El índice de condición (IC), que relaciona el peso seco de la carne con el peso seco de las valvas, no presentó diferencias significativas entre los sexos ($P > 0,05$, ANOVA). La evolución del IC durante el primer año es similar para ambos sexos alcanzando los valores máximos en el muestreo de mayo (Figura 4.1). Durante el segundo año de muestreo, los valores del IC presentaron un incremento menos acentuado, con diferencias en relación al pico de IC observado en hembras en junio (65,83 \pm 24,30) y en septiembre para los machos (64,53 \pm 26,50).

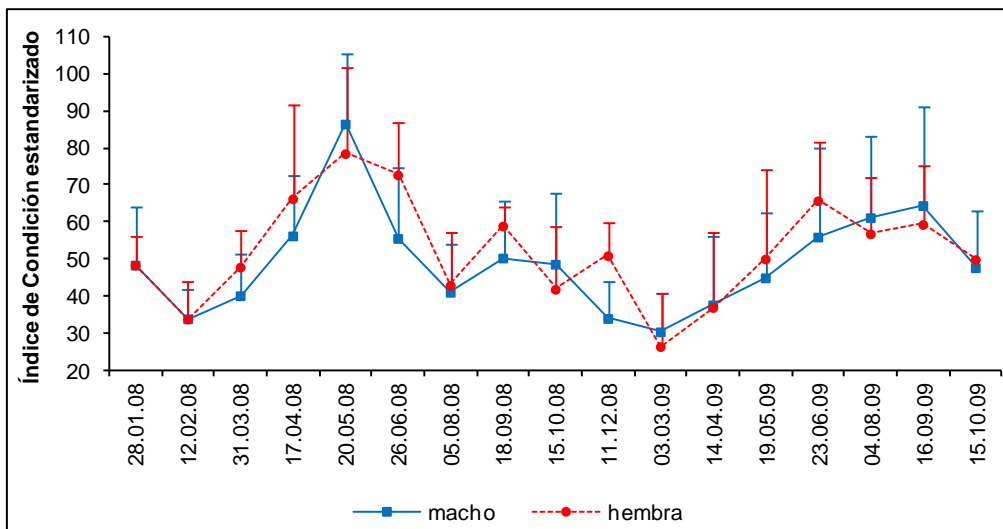


Figura 4.1. Evolución del Índice de Condición para machos (dato medio + de) y hembras (dato medio + de) de *C. gigas* cultivadas en la Ría de Arousa.

El índice de ocupación gonadal (IOG), que determina el porcentaje de ocupación de gametos dentro de la gónada, presentó una distribución similar entre los sexos en los dos años de estudio, con valores máximos en mayo de 2008 y junio de 2009 (Figura 4.2). Sin embargo, pasado el primer periodo de puesta de 2008, los machos mantienen valores elevados durante el otoño pero con gran dispersión, lo que puede indicar la coexistencia de individuos maduros e individuos que ya hayan puesto.

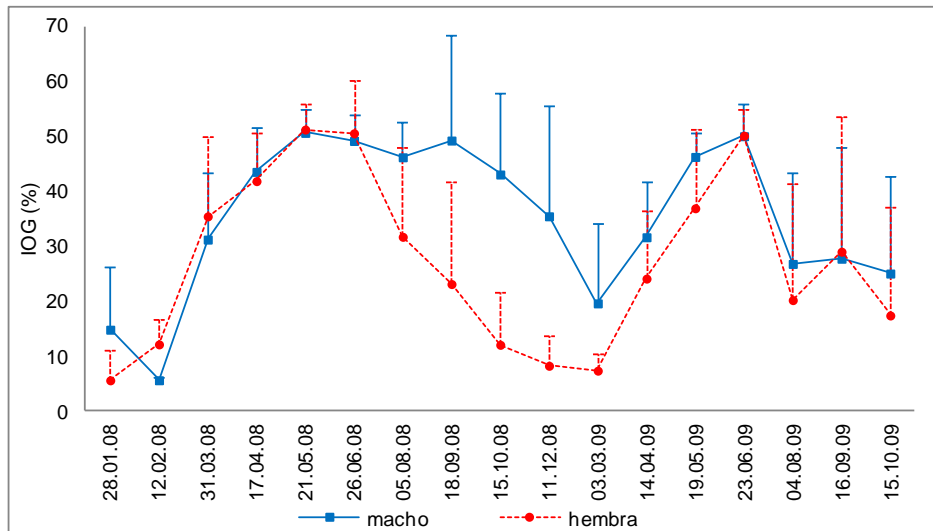


Figura 4.2. Evolución del Índice de Ocupación Gonadal para machos (dato medio + de) y hembras (dato medio + de) de *C. gigas* cultivados en la Ría de Arousa.

La talla media de los ovocitos se incrementa constantemente durante la primavera hasta alcanzar los valores máximos en junio de 2008 y 2009, cuando son evaluados todos los ovocitos y en agosto de 2008 y junio de 2009, para los ovocitos que presentaban la vesícula germinal bien definida (Figura 4.3). Los valores máximos alcanzados son significativamente superiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el análisis de los ovocitos con vesícula germinal.

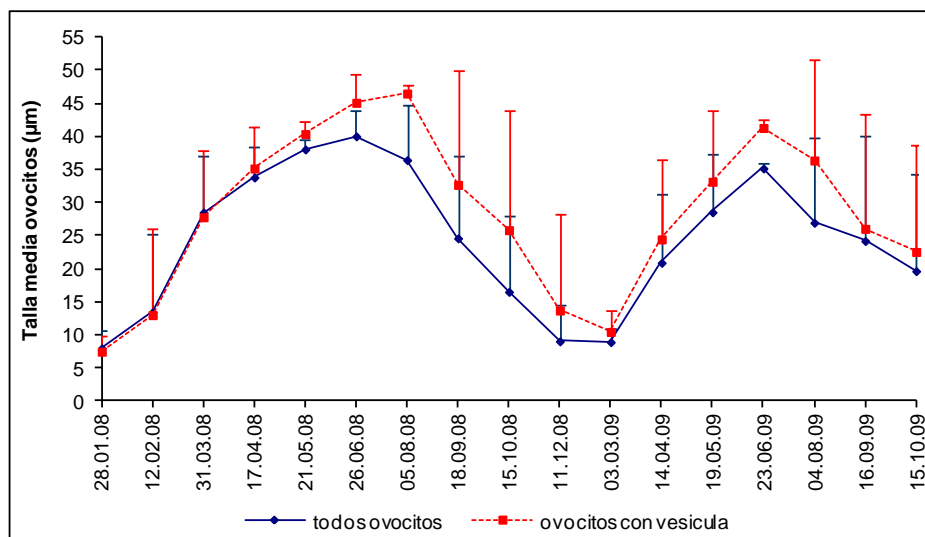


Figura 4.3. Evolución de la talla media de los ovocitos (dato medio + de) de *C. gigas* cultivadas en la Ría de Arousa, evaluando todos los ovocitos y solamente los que presentaban vesícula germinal bien definida.

Los estadios de desarrollo gonadal en machos presentan en el primer año de estudio una maduración durante el invierno y primavera. Las puestas se dan entre los meses de mayo y

diciembre, con dos picos, uno entre mayo y septiembre y otro, con mayor intensidad entre los meses de octubre y diciembre (Figura 4.4). En el segundo año, las puestas ocurren también en dos períodos, sin embargo el segundo pico de puesta, de mayor intensidad, es adelantado para el mes de agosto.

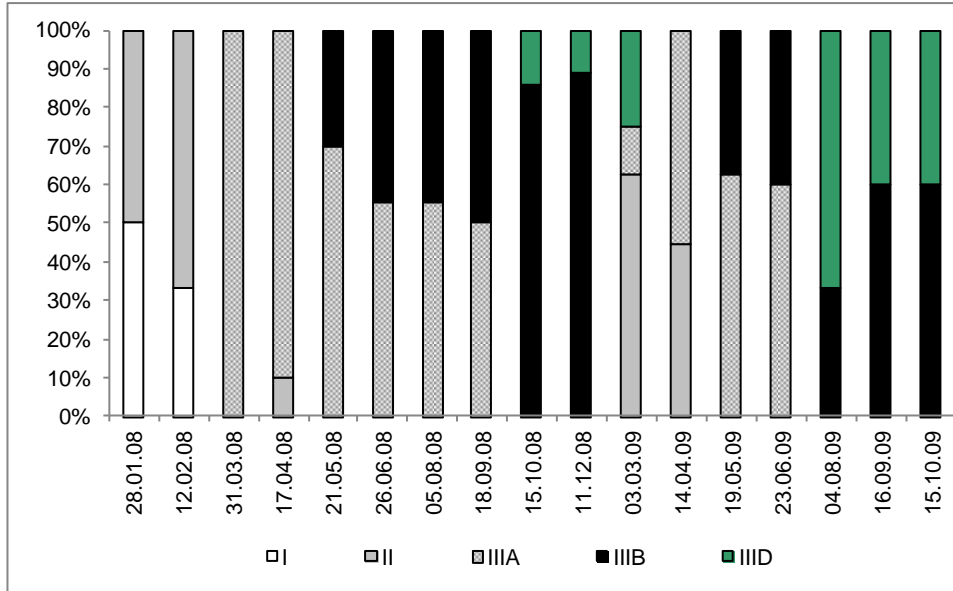


Figura 4.4. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para machos de *C. gigas*.

En hembras, la ovogénesis ocurre durante el invierno y primavera llegando a la máxima maduración en junio de 2008 y mayo de 2009 (Figura 4.5). La puesta se da masivamente en ambos años con inicio en agosto de 2008 y junio de 2009.

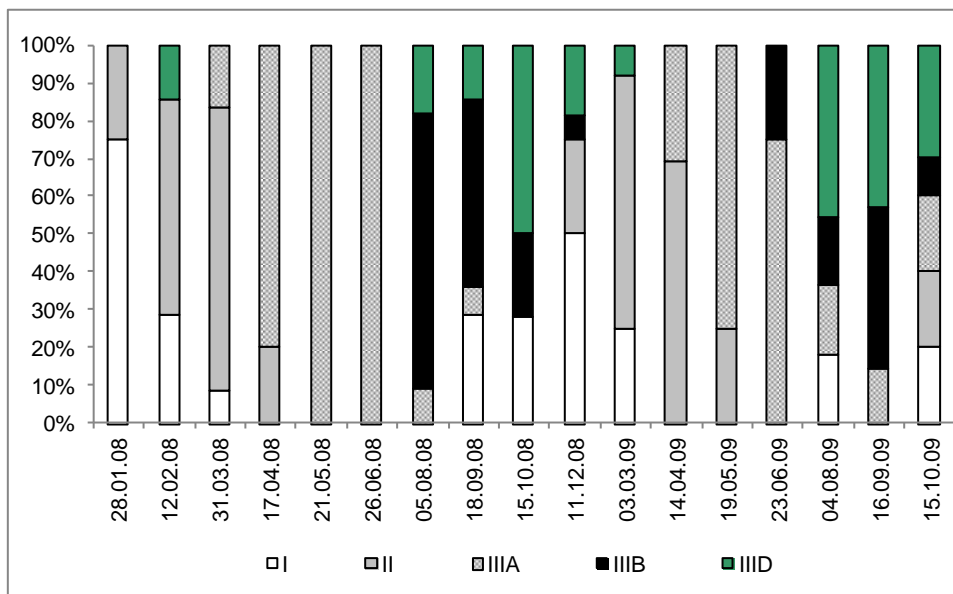


Figura 4.5. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para hembras de *C. gigas*.

4.3.2. Medidas biométricas

El peso total, peso fresco de la carne, peso seco estandarizado, longitud y anchura de las ostras fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a la fecha de muestreo (Tabla 4.1). Los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) de longitud y anchura fueron observados en el muestreo de marzo de 2009 ($105,0 \pm 11,5$ cm y $54,8 \pm 4,8$ cm). El peso total siguió un patrón similar al observado con los datos de morfometría, con un valor máximo en marzo de 2009 ($89,7 \pm 21,1$ g) y el más bajo en enero de 2008 ($19,5 \pm 11,3$ g).

Con relación al peso seco estandarizado los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron observados en los muestreos de octubre de 2008 y junio de 2009 ($1,6 \pm 0,5$ y $1,6 \pm 0,4$ g.ind⁻¹), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron observados en el muestreo de enero de 2008 ($0,3 \pm 0,2$ g.ind⁻¹). El peso fresco de la carne registró los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en los meses de agosto y octubre de 2008, mientras los más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron observados en el primer muestreo del estudio ($1,5 \pm 1,0$ g.ind⁻¹).

Tabla 4.1. Medidas biométricas en *Crassostrea gigas* cultivada en la Ría de Arousa, entre enero de 2008 y octubre de 2009. Los datos de peso total, peso fresco de la carne y peso seco estandarizado aparecen expresados en g.ind⁻¹ (\pm de) y los datos de longitud y anchura aparecen expresados en cm (\pm de).

Meses	Peso total (g ind ⁻¹)	Peso fresco carne (g ind ⁻¹)	Peso seco estand. (g.ind ⁻¹)	Longitud (cm)	Anchura (cm)
2008					
Enero	$19,5 \pm 11,3^h$	$1,5 \pm 1,0^f$	$0,3 \pm 0,2^f$	$70,9 \pm 11,7^f$	-
Febrero	$46,3 \pm 5,5^{ef}$	$5,7 \pm 1,4^{def}$	$0,8 \pm 0,1^{de}$	$87,1 \pm 4,7^{bcde}$	$50,9 \pm 6,8^{bcde}$
Marzo	$44,3 \pm 12,1^{efg}$	$5,2 \pm 1,6^{ef}$	$0,7 \pm 0,2^e$	$85,4 \pm 10,2^{bcde}$	$47,3 \pm 7,8^{def}$
Abril	$34,3 \pm 8,6^g$	$5,0 \pm 1,7^{ef}$	$0,8 \pm 0,3^{cde}$	$82,5 \pm 10,2^{de}$	$41,9 \pm 7,1^f$
Mayo	$42,7 \pm 8,3^{efg}$	$6,7 \pm 2,1^{bcdef}$	$1,3 \pm 0,4^{abc}$	$89,3 \pm 10,4^{bcde}$	$51,6 \pm 10,3^{bcde}$
Junio	$58,2 \pm 16,6^{cde}$	$6,6 \pm 1,7^{bcdef}$	$1,1 \pm 0,3^{abcde}$	$98,7 \pm 10,3^{abc}$	$57,8 \pm 6,5^{abc}$
Agosto	$75,4 \pm 12,9^{ab}$	$10,3 \pm 2,7^a$	$1,4 \pm 0,4^{ab}$	$107,8 \pm 10,1^a$	$59,5 \pm 5,7^{ab}$
Septiembre	$62,4 \pm 9,0^{bcd}$	$9,0 \pm 2,8^{abc}$	$1,5 \pm 0,5^{ab}$	$94,4 \pm 9,8^{abcd}$	$57,4 \pm 9,4^{abc}$
Octubre	$75,3 \pm 13,5^{ab}$	$10,6 \pm 3,1^a$	$1,6 \pm 0,5^a$	$98,8 \pm 10,6^{abc}$	$57,7 \pm 6,3^{abc}$
Diciembre	$80,6 \pm 23,0^{ab}$	$8,9 \pm 3,1^{ac}$	$1,2 \pm 0,4^{abcd}$	$103,0 \pm 12,4^a$	$54,8 \pm 4,8^{abcd}$
2009					
Marzo	$89,7 \pm 21,1^a$	$9,0 \pm 1,9^{abc}$	$1,1 \pm 0,3^{abcd}$	$105,0 \pm 11,5^a$	$61,5 \pm 4,3^a$
Abril	$68,7 \pm 18,6^{abc}$	$6,6 \pm 2,3^{bcdef}$	$1,2 \pm 0,5^{abcde}$	$98,7 \pm 11,3^{ac}$	$61,0 \pm 6,5^{ac}$
Mayo	$50,7 \pm 6,3^{def}$	$6,2 \pm 1,8^{bcdef}$	$1,2 \pm 0,4^{abcde}$	$88,9 \pm 9,2^{bcde}$	$54,4 \pm 5,1^{abcd}$
Junio	$47,0 \pm 7,0^{ef}$	$8,6 \pm 1,5^{abc}$	$1,6 \pm 0,4^a$	$85,5 \pm 7,3^{bde}$	$49,6 \pm 4,8^{cdef}$
Agosto	$50,6 \pm 8,7^{def}$	$7,7 \pm 1,7^{abcde}$	$1,4 \pm 0,4^{ab}$	$83,1 \pm 11,7^{de}$	$47,9 \pm 4,9^{def}$
Septiembre	$46,3 \pm 7,4^{def}$	$5,9 \pm 1,9^{bdef}$	$1,5 \pm 0,6^{ab}$	$76,4 \pm 4,7^{ef}$	$47,5 \pm 5,9^{def}$
Octubre	$40,1 \pm 9,1^{fg}$	$4,1 \pm 1,4^e$	$0,9 \pm 0,3^{bcde}$	$75,6 \pm 5,0^{ef}$	$45,0 \pm 3,7^{ef}$

*Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK).

4.3.3. Composición bioquímica

4.3.3.1. Composición bioquímica general

La composición bioquímica general de los tejidos blandos y el contenido en materia orgánica de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* se muestra en la Tabla 4.2. Estos datos representan el promedio (\pm de) de todos los organismos en cada muestreo sin tener en cuenta la diferenciación sexual.

El contenido en materia orgánica de *C. gigas* varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a la fecha de muestreo (Tabla 4.2), aumentando significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) sus valores hasta el muestreo de mayo de 2008, seguido de una bajada no significativa ($P > 0,05$, ANOVA, SNK) en los meses de junio y agosto de 2008. Durante el segundo año de muestreo los valores del contenido en materia orgánica presentan una evolución similar al primer año, con un incremento significativo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) hasta junio ($1462,4 \pm 408,3 \text{ mg.ind}^{-1}$).

El principal componente de las ostras cultivadas fueron las proteínas, que representan del 41,4% observado en octubre de 2008 a los 63,0% en agosto de 2008. Los lípidos y los carbohidratos presentan valores promedios similares, con variaciones en carbohidratos del 7,9% al 41,2% y en lípidos del 10,8% al 36,9% dependiendo de la fecha de muestreo. El glucógeno alcanza valores que oscilaron entre el 3,6% y el 18,7% (Tabla 4.2).

La cantidad total de proteínas (mg.ind^{-1}) aumenta significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) con la fecha de muestreo alcanzando los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el muestreo de junio de 2009 ($805,8 \pm 240,1 \text{ mg.ind}^{-1}$), mientras que los mínimos fueron encontrados en los primeros tres meses de muestreo (Tabla 4.2).

La concentración de carbohidratos (mg.ind^{-1}) en los tejidos de las ostras varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a los meses de muestreo (Tabla 4.2). El valor significativamente más alto de carbohidratos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontró en el mes de agosto de 2009 ($551,4 \pm 301,8 \text{ mg.ind}^{-1}$), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontraron en enero de 2008 ($22,6 \pm 24,9 \text{ mg.ind}^{-1}$) (Tabla 4.2).

La evolución de la cantidad total de glucógeno (mg.ind^{-1}) se asemeja a la evolución del contenido total de carbohidratos, con valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en los dos primeros muestreos del estudio ($9,5 \pm 8,3$ y $47,4 \pm 29,0 \text{ mg.ind}^{-1}$) y valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el mes de agosto de 2009 ($248,0 \pm 124,0 \text{ mg.ind}^{-1}$), sin embargo el máximo de glucógeno fue observado en el muestreo de octubre de 2008 ($273,0 \pm 161,2 \text{ mg.ind}^{-1}$) diferenciándose de la evolución de carbohidratos (Tabla 4.2).

La concentración de lípidos totales (mg.ind^{-1}) en los tejidos de las ostras varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a los meses de muestreo (Tabla 4.2). Los

valores significativamente más altos de lípidos totales ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron encontrados en el segundo año de muestreo (2009) en los meses junio y septiembre ($445,5 \pm 191$ y $492,8 \pm 242,7$ mg.ind⁻¹), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontraron de enero a abril de 2008 ($40,6 \pm 35,5$ a $105,8 \pm 60,6$ mg.ind⁻¹) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Composición bioquímica general de *Crassostrea gigas* cultivada en la Ría de Arousa, entre enero de 2008 y octubre de 2009. Los datos aparecen expresados en mg.ind⁻¹(± de) y en porcentaje relativo al total de la materia orgánica (%MO).

Meses	Materia orgánica	Proteínas		Carbohidratos		Glucógeno		Lípidos	
	mg.ind ⁻¹	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO
2008									
Enero	236,0 ± 147,6 ^f	129,3 ± 70,2 ^e	56,3 ± 4,7 ^{bcd}	22,6 ± 24,9 ^e	7,9 ± 3,7 ^e	9,5 ± 8,3 ^f	3,6 ± 1,1 ^e	40,6 ± 35,5 ^e	15,5 ± 3,6 ^{de}
Febrero	632,3 ± 112,0 ^{de}	365,0 ± 60,1 ^d	57,9 ± 1,8 ^{abcd}	114,6 ± 53,5 ^d	17,5 ± 5,2 ^{cd}	47,4 ± 29,0 ^e	7,2 ± 3,2 ^{cde}	78,5 ± 20,7 ^d	12,6 ± 3,4 ^{de}
Marzo	622,7 ± 183,3 ^e	372,0 ± 86,9 ^d	60,6 ± 4,8 ^{abc}	133,7 ± 82,1 ^{cd}	20,2 ± 7,2 ^{cd}	53,6 ± 32,1 ^{de}	8,1 ± 2,5 ^{cde}	65,7 ± 31,1 ^d	10,8 ± 4,7 ^e
Abril	713,1 ± 244,8 ^{cde}	449,6 ± 183,1 ^{bcd}	62,2 ± 5,2 ^{ab}	153,6 ± 59,7 ^{bcd}	22,2 ± 7,3 ^{bcd}	65,6 ± 28,3 ^{cde}	9,4 ± 3,4 ^{cd}	105,8 ± 60,6 ^d	14,7 ± 6,0 ^{de}
Mayo	1206,7 ± 405,3 ^{abc}	605,5 ± 199,8 ^{abcd}	50,8 ± 6,8 ^{de}	207,8 ± 164,0 ^{bcd}	15,9 ± 9,1 ^{de}	82,2 ± 64,3 ^{cde}	6,3 ± 3,7 ^{de}	207,7 ± 101,5 ^{bc}	16,6 ± 4,5 ^{de}
Junio	1006,5 ± 273,0 ^{bcde}	544,6 ± 160,0 ^{abcd}	54,0 ± 4,7 ^d	209,9 ± 115,8 ^{bcd}	20,4 ± 9,6 ^{cd}	87,8 ± 57,9 ^{cde}	8,2 ± 4,0 ^{cde}	162,4 ± 61,3 ^c	16,2 ± 5,0 ^{de}
Agosto	1183,4 ± 353,2 ^{abc}	755,2 ± 276,7 ^{ab}	63,0 ± 6,4 ^a	346,6 ± 186,1 ^{abc}	28,0 ± 10,4 ^{bc}	144,4 ± 77,7 ^{abcde}	11,6 ± 4,4 ^{abcd}	253,7 ± 93,1 ^{abc}	23,9 ± 5,8 ^{bc}
Septiembre	1273,0 ± 450,0 ^{ab}	664,0 ± 228,9 ^{abc}	52,7 ± 7,9 ^d	348,3 ± 213,8 ^{abcd}	26,4 ± 12,3 ^{bc}	182,8 ± 114,8 ^{abc}	13,5 ± 4,6 ^{ab}	240,5 ± 104,4 ^{abc}	19,6 ± 7,5 ^{cd}
Octubre	1420,9 ± 464,7 ^{ab}	590,8 ± 218,7 ^{abcd}	41,4 ± 5,1 ^f	352,6 ± 153,4 ^{abc}	24,3 ± 7,1 ^{bc}	273,0 ± 161,2 ^a	18,4 ± 6,9 ^{ab}	370,5 ± 112,3 ^{ab}	26,6 ± 3,8 ^{bc}
Diciembre	1077,3 ± 390,0 ^{abc}	439,9 ± 116,7 ^{bcd}	42,4 ± 7,2 ^f	288,6 ± 219,0 ^{abcd}	23,6 ± 11,4 ^{bcd}	165,2 ± 123,6 ^{abcde}	13,9 ± 6,6 ^{abc}	259,5 ± 121,0 ^{abc}	23,7 ± 6,6 ^{bc}
2009									
Marzo	965,4 ± 233,5 ^{abcde}	419,0 ± 81,4 ^{abcd}	43,9 ± 3,2 ^f	258,6 ± 124,7 ^{abcd}	25,9 ± 9,1 ^{bc}	128,1 ± 73,8 ^{abcde}	12,8 ± 6,2 ^{abcd}	284,6 ± 85,1 ^{abc}	29,9 ± 7,6 ^{ab}
Abril	1067,9 ± 501,4 ^{abcd}	461,9 ± 183,1 ^{cd}	44,5 ± 3,5 ^f	329,0 ± 239,5 ^{abcd}	27,6 ± 10,2 ^{bc}	155,6 ± 125,3 ^{abcde}	12,7 ± 5,7 ^{abcd}	276,6 ± 140,6 ^{abc}	25,6 ± 4,0 ^{bc}
Mayo	1049,2 ± 416,2 ^{abcde}	534,6 ± 226,7 ^{cd}	50,5 ± 3,5 ^{de}	233,4 ± 117,6 ^{abcd}	22,5 ± 8,3 ^{bcd}	116,1 ± 69,6 ^{abcde}	10,9 ± 4,4 ^{bcd}	310,5 ± 176,0 ^{abc}	28,3 ± 5,7 ^{ab}
Junio	1462,4 ± 408,3 ^a	805,8 ± 240,1 ^a	54,8 ± 2,1 ^{cd}	343,5 ± 134,6 ^{ab}	23,2 ± 3,6 ^{bcd}	150,2 ± 55,6 ^{abcd}	10,2 ± 1,6 ^{cd}	445,5 ± 191,8 ^a	30,0 ± 6,8 ^b
Agosto	1291,7 ± 401,9 ^{ab}	587,4 ± 169,3 ^{abcd}	45,9 ± 3,7 ^{ef}	551,4 ± 301,8 ^a	41,2 ± 11,6 ^a	248,0 ± 124,0 ^{ab}	18,7 ± 4,4 ^a	331,7 ± 157,6 ^{abc}	24,8 ± 6,1 ^{bc}
Septiembre	1322,2 ± 540,1 ^{ab}	710,0 ± 304,7 ^{abc}	53,8 ± 7,0 ^{cd}	403,2 ± 227,7 ^{ab}	30,6 ± 16,5 ^b	138,4 ± 111,3 ^{bcde}	9,8 ± 7,5 ^{cde}	492,8 ± 242,7 ^a	36,9 ± 7,7 ^a
Octubre	844,9 ± 276,7 ^{bcde}	442,3 ± 141,6 ^{bcd}	52,7 ± 3,5 ^d	265,7 ± 124,9 ^{abcd}	29,9 ± 8,6 ^b	116,2 ± 55,7 ^{abcde}	13,2 ± 4,8 ^{abc}	240,1 ± 80,0 ^{abc}	28,6 ± 4,1 ^b

*Letras diferentes indican diferencia significativa (P<0,05, ANOVA, SNK).

4.3.3.2. Diferenciación sexual

Este apartado presenta los resultados de la evolución de los principales componentes bioquímicos (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos) de los tejidos de la ostra japonesa *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa, tomándose en consideración las diferencias entre los sexos. En los dos primeros muestreos (enero y febrero de 2008) no se encontraron hembras entre los organismos analizados, comparándose la evolución de los componentes bioquímicos entre marzo de 2008 y octubre de 2009.

4.3.3.2.1. Contenido en materia orgánica

El contenido en materia orgánica expresado en mg.ind^{-1} de la ostra *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa no presentó diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA) entre los sexos (Figura 4.6, Tablas 4.3 y 4.4).

La evolución del contenido en materia orgánica en relación a los meses de muestreo presentó diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA) tanto en machos como en hembras (Figura 4.6, Tablas 4.3 y 4.4). En ambos sexos, los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron encontrados en el muestreo de junio de 2009 ($1418,3 \pm 328,8$ y $1506,6 \pm 511,9 \text{ mg.ind}^{-1}$, machos y hembras respectivamente), mientras los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se observaron en los muestreos de enero y marzo de 2008 para machos ($236,0 \pm 147,6$ y $619,8 \pm 140,2 \text{ mg.ind}^{-1}$) y marzo de 2008 para hembras ($625,6 \pm 23,5 \text{ mg.ind}^{-1}$).

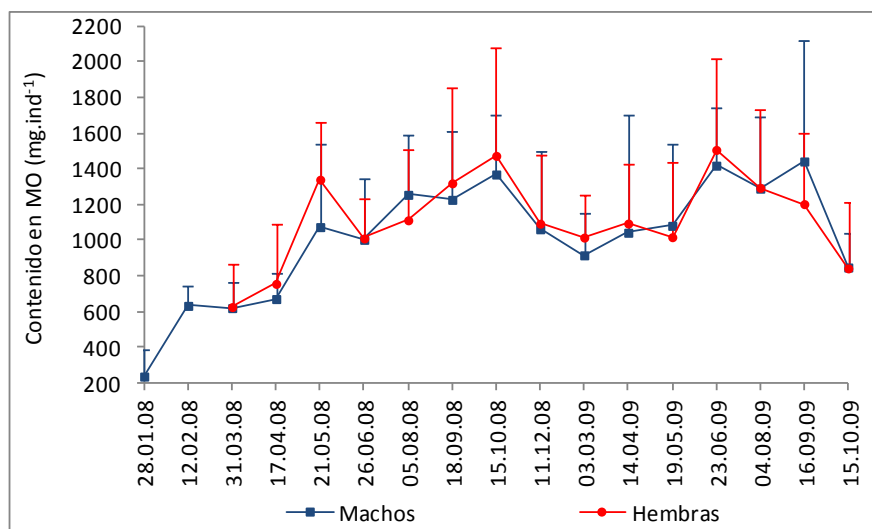


Figura 4.6. Evolución del contenido medio en materia orgánica (MO, mg.ind^{-1}) estandarizado a la talla media, en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

Tabla 4.3. Composición bioquímica de machos de *Crassostrea gigas* cultivados en la Ría de Arousa, entre enero de 2008 y octubre de 2009. Los datos aparecen expresados en mg.ind⁻¹(± de) y en porcentaje relativo al total de materia orgánica (%MO).

Meses	Materia orgánica mg.ind ⁻¹	Proteínas		Carbohidratos		Glucógeno		Lípidos	
		mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO
2008									
Enero	236,0 ± 147,6 ^c	129,3 ± 70,2 ^d	56,3 ± 4,7 ^{bcd}	22,6 ± 24,9 ^c	7,9 ± 3,7 ^d	9,5 ± 8,3 ^d	3,6 ± 1,1 ^d	40,6 ± 35,5 ^c	15,5 ± 3,6 ^{cde}
Febrero	632,3 ± 112,0 ^{ab}	365,0 ± 60,1 ^{cd}	57,9 ± 1,8 ^{bc}	114,6 ± 53,5 ^b	17,5 ± 5,2 ^{bcd}	47,4 ± 29,0 ^c	7,2 ± 3,2 ^{bcd}	78,5 ± 20,7 ^{bc}	12,6 ± 3,4 ^e
Marzo	619,8 ± 140,2 ^b	370,0 ± 61,7 ^{cd}	60,4 ± 4,8 ^{abc}	117,6 ± 73,6 ^b	17,8 ± 7,5 ^{bcd}	45,6 ± 20,3 ^c	7,1 ± 1,8 ^{bcd}	80,8 ± 28,6 ^{bc}	13,2 ± 4,4 ^{cde}
Abril	670,5 ± 144,1 ^{ab}	422,1 ± 135,7 ^{abcd}	62,1 ± 7,1 ^{ab}	143,0 ± 65,1 ^{ab}	22,1 ± 9,7 ^{bcd}	61,0 ± 32,9 ^{abc}	9,3 ± 4,7 ^{bcd}	78,6 ± 58,7 ^{bc}	11,3 ± 6,1 ^e
Mayo	1073,8 ± 467,7 ^{ab}	600,5 ± 267,9 ^{abc}	55,2 ± 3,6 ^{bcd}	162,3 ± 123,1 ^{ab}	13,8 ± 6,6 ^{cd}	67,3 ± 64,0 ^{bc}	5,7 ± 3,8 ^{cd}	163,6 ± 82,5 ^{ab}	15,0 ± 2,7 ^{cde}
Junio	1002,6 ± 344,3 ^{ab}	553,2 ± 192,4 ^{abc}	55,1 ± 3,0 ^{bcd}	192,4 ± 112,7 ^{ab}	18,9 ± 8,4 ^{bcd}	93,2 ± 71,1 ^{abc}	8,5 ± 4,1 ^{bcd}	150,7 ± 57,6 ^{ab}	15,5 ± 6,4 ^{cde}
Agosto	1254,7 ± 337,7 ^{ab}	824,4 ± 254,3 ^a	65,6 ± 5,7 ^a	378,1 ± 216,7 ^{ab}	28,8 ± 13,0 ^{abc}	157,4 ± 89,2 ^{abc}	11,8 ± 5,1 ^{abc}	305,0 ± 105,8 ^{ab}	26,3 ± 6,5 ^{ab}
Septiembre	1226,7 ± 384,0 ^{ab}	729,1 ± 251,9 ^{abc}	59,0 ± 2,8 ^{abc}	433,2 ± 169,2 ^{ab}	35,2 ± 7,1 ^{ab}	179,5 ± 76,1 ^{abc}	14,4 ± 3,0 ^{ab}	198,0 ± 103,2 ^{ab}	16,7 ± 7,6 ^{cde}
Octubre	1368,7 ± 333,5 ^{ab}	605,3 ± 169,3 ^{abc}	43,9 ± 3,7 ^f	316,2 ± 109,2 ^{ab}	23,1 ± 4,9 ^{bc}	220,9 ± 75,4 ^{ab}	16,3 ± 4,1 ^{ab}	361,4 ± 97,5 ^a	26,5 ± 3,0 ^{ab}
Diciembre	1061,8 ± 434,9 ^{ab}	474,7 ± 131,6 ^{abcd}	46,9 ± 7,2 ^{ef}	259,5 ± 233,8 ^{ab}	20,3 ± 13,5 ^{bcd}	116,1 ± 96,5 ^{abc}	9,3 ± 4,9 ^{bcd}	204,1 ± 103,0 ^{ab}	18,7 ± 6,0 ^{bcde}
2009									
Marzo	915,6 ± 239,1 ^{ab}	394,8 ± 74,6 ^{bcd}	43,7 ± 3,8 ^f	239,2 ± 114,5 ^{ab}	25,4 ± 7,6 ^{bc}	111,3 ± 52,9 ^{abc}	12,1 ± 5,0 ^{abc}	260,1 ± 64,9 ^a	29,1 ± 7,9 ^{ab}
Abril	1042,2 ± 661,4 ^{ab}	439,3 ± 226,6 ^{abcd}	44,4 ± 4,4 ^f	300,5 ± 312,3 ^{ab}	24,1 ± 11,4 ^{bc}	154,2 ± 166,9 ^{abc}	11,8 ± 6,5 ^{abc}	244,7 ± 178,6 ^{ab}	23,0 ± 3,0 ^{abc}
Mayo	1080,9 ± 457,1 ^{ab}	523,6 ± 228,1 ^{abc}	48,2 ± 1,5 ^{def}	264,0 ± 135,5 ^{ab}	24,0 ± 6,0 ^{bc}	137,4 ± 82,5 ^{abc}	12,2 ± 3,3 ^{abc}	288,7 ± 151,6 ^a	26,1 ± 3,1 ^{ab}
Junio	1418,3 ± 328,8 ^a	775,4 ± 196,7 ^{abc}	54,4 ± 2,3 ^{bcd}	309,1 ± 66,0 ^{ab}	22,0 ± 3,2 ^{bcd}	138,2 ± 31,7 ^{abc}	9,9 ± 1,8 ^{abcd}	348,8 ± 67,7 ^a	24,9 ± 3,1 ^{abc}
Agosto	1289,4 ± 403,7 ^{ab}	572,9 ± 142,6 ^{abc}	45,1 ± 4,0 ^f	574,4 ± 326,8 ^a	42,5 ± 9,9 ^a	263,6 ± 149,8 ^a	19,5 ± 4,7 ^a	289,4 ± 121,1 ^a	22,1 ± 3,1 ^{abcd}
Septiembre	1441,7 ± 681,6 ^{ab}	802,0 ± 381,4 ^{ab}	55,3 ± 5,2 ^{bcd}	335,9 ± 257,0 ^{ab}	21,7 ± 8,6 ^{bcd}	108,3 ± 78,7 ^{abc}	7,1 ± 3,3 ^{bcd}	475,5 ± 303,8 ^a	31,4 ± 4,7 ^a
Octubre	847,4 ± 190,2 ^{ab}	442,6 ± 92,5 ^{abcd}	52,5 ± 3,4 ^{cde}	273,9 ± 112,7 ^{ab}	31,3 ± 10,2 ^{abc}	117,5 ± 55,1 ^{abc}	13,4 ± 5,9 ^{abc}	239,4 ± 58,9 ^a	28,3 ± 3,1 ^{ab}

*Letras diferentes indican diferencia significativa (P<0,05, ANOVA, SNK).

Tabla 4.4. Composición bioquímica de hembras de *Crassostrea gigas* cultivadas en la Ría de Arousa, entre marzo de 2008 y octubre de 2009. Los datos aparecen expresados en mg.ind⁻¹(± de) y en porcentaje relativo al total de materia orgánica (%MO).

Meses	Materia orgánica		Proteínas		Carbohidratos		Glucógeno		Lípidos	
	mg.ind ⁻¹		mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO
2008										
Marzo	625,6 ± 23,5 ^d		374,0 ± 114,8 ^c	60,8 ± 5,3 ^{ab}	149,7 ± 95,4 ^d	22,6 ± 6,7 ^{cd}	61,6 ± 41,8 ^e	9,2 ± 2,9 ^{cd}	50,6 ± 28,0 ^d	8,4 ± 4,1 ^f
Abril	755,6 ± 330,9 ^{cd}		477,1 ± 234,8 ^{bc}	62,2 ± 3,1 ^a	164,2 ± 59,0 ^{cd}	22,4 ± 5,2 ^{cd}	70,3 ± 25,9 ^{de}	9,5 ± 2,0 ^{cd}	133,0 ± 54,4 ^c	18,0 ± 4,0 ^e
Mayo	1339,6 ± 326,6 ^{ab}		610,4 ± 134,1 ^{abc}	46,3 ± 6,5 ^{de}	253,2 ± 200,5 ^{bcd}	18,0 ± 11,5 ^d	97,1 ± 68,3 ^{bcd}	7,0 ± 3,8 ^d	251,9 ± 107,2 ^{abc}	18,3 ± 5,6 ^e
Junio	1010,3 ± 221,5 ^{abcd}		536,0 ± 142,9 ^{bc}	52,8 ± 6,1 ^{cd}	227,4 ± 129,3 ^{cd}	21,9 ± 11,5 ^{cd}	82,4 ± 49,2 ^{cde}	7,9 ± 4,2 ^{cd}	174,2 ± 69,2 ^{bc}	16,9 ± 3,9 ^e
Agosto	1112,0 ± 392,3 ^{abcd}		686,0 ± 309,1 ^{ab}	60,5 ± 6,6 ^{ab}	315,1 ± 168,7 ^{abcd}	27,2 ± 8,5 ^{abcd}	131,4 ± 72,2 ^{abcde}	11,4 ± 4,2 ^{bcd}	202,3 ± 44,5 ^{abc}	21,6 ± 4,5 ^{de}
Septiembre	1319,3 ± 541,2 ^{ab}		598,9 ± 204,0 ^{abc}	46,4 ± 5,8 ^{de}	263,4 ± 233,8 ^{bcd}	17,7 ± 9,9 ^d	186,1 ± 152,2 ^{abcde}	12,6 ± 5,9 ^{bcd}	282,9 ± 94,9 ^{abc}	22,5 ± 6,9 ^{de}
Octubre	1473,1 ± 606,5 ^a		576,3 ± 280,0 ^{bc}	38,9 ± 5,4 ^f	388,9 ± 194,3 ^{abc}	25,5 ± 9,2 ^{bcd}	325,0 ± 214,5 ^a	20,5 ± 8,9 ^a	379,7 ± 136,6 ^{ab}	26,7 ± 4,8 ^{cd}
Diciembre	1092,8 ± 390,5 ^{abcd}		405,1 ± 101,5 ^c	38,0 ± 3,9 ^f	317,8 ± 226,0 ^{abcd}	26,9 ± 9,0 ^{abcd}	214,3 ± 138,0 ^{abc}	18,4 ± 4,8 ^{ab}	315,0 ± 121,1 ^{abc}	28,7 ± 0,9 ^{bcd}
2009										
Marzo	1015,1 ± 243,6 ^{abcd}		443,2 ± 88,7 ^{bc}	44,0 ± 2,9 ^{ef}	278,0 ± 144,6 ^{bcd}	26,3 ± 11,3 ^{bcd}	144,9 ± 93,6 ^{abcde}	13,6 ± 7,8 ^{abcd}	309,1 ± 103,0 ^{abc}	30,8 ± 8,2 ^{bc}
Abril	1093,6 ± 337,6 ^{abcd}		484,5 ± 145,5 ^{bc}	44,6 ± 2,7 ^{ef}	357,4 ± 163,5 ^{abcd}	31,1 ± 8,2 ^{abc}	157,0 ± 81,7 ^{abcde}	13,5 ± 5,2 ^{abc}	308,6 ± 95,5 ^{abc}	28,2 ± 3,2 ^{bcd}
Mayo	1017,4 ± 422,2 ^{abcd}		545,6 ± 251,6 ^{bc}	52,8 ± 3,5 ^{cd}	202,8 ± 102,1 ^{cd}	21,1 ± 10,7 ^{cd}	94,7 ± 54,2 ^{bcd}	9,7 ± 5,4 ^{cd}	332,3 ± 213,4 ^{abc}	30,5 ± 7,2 ^{bc}
Junio	1506,6 ± 511,9 ^a		836,1 ± 297,8 ^a	55,2 ± 2,0 ^{bc}	378,0 ± 182,9 ^{abcd}	24,3 ± 4,0 ^{cd}	162,3 ± 74,8 ^{abcd}	10,5 ± 1,6 ^{cd}	542,1 ± 234,2 ^a	35,1 ± 5,4 ^{ab}
Agosto	1294,0 ± 438,5 ^{ab}		602,0 ± 205,4 ^{abc}	46,7 ± 3,6 ^{de}	528,3 ± 303,8 ^a	39,9 ± 13,9 ^a	232,3 ± 103,6 ^{ab}	18,0 ± 4,5 ^{ab}	374,0 ± 188,9 ^{abc}	27,5 ± 7,3 ^{cd}
Septiembre	1202,6 ± 395,0 ^{abc}		617,9 ± 205,7 ^{abc}	52,2 ± 8,7 ^{cd}	470,6 ± 198,2 ^{ab}	39,4 ± 18,5 ^{ab}	168,5 ± 139,4 ^{cde}	12,4 ± 9,9 ^{cd}	510,1 ± 198,8 ^a	42,4 ± 6,0 ^a
Octubre	842,5 ± 368,9 ^{bcd}		442,1 ± 191,1 ^{bc}	52,8 ± 4,1 ^{cd}	257,6 ± 149,0 ^{bcd}	28,5 ± 7,7 ^{abcd}	114,8 ± 62,7 ^{abcde}	13,1 ± 4,2 ^{abcd}	240,8 ± 104,5 ^{abc}	29,0 ± 5,3 ^{bcd}

*Letras diferentes indican diferencia significativa (P<0,05, ANOVA, SNK).

4.3.3.2.2. **Proteínas**

La evolución de las proteínas en contenido total (mg.ind^{-1}) no presentó diferencia significativa entre los sexos ($P>0,05$, ANOVA) (Figura 4.7), sin embargo los datos expresados en porcentaje de MO fueron significativamente diferentes ($P<0,05$, ANOVA), con superioridad de los machos en los muestreos de mayo, septiembre y diciembre de 2008 y superioridad por parte de las hembras en mayo de 2009 (Figura 4.8).

Los machos y hembras presentan valores en contenido total y en porcentaje dentro de la materia orgánica significativamente diferentes ($P<0,05$, ANOVA) en función de la fecha de muestreo. Con relación a la evolución en machos, los valores significativamente más altos ($P<0,05$, ANOVA, SNK) en contenido total y en porcentaje dentro de la MO fueron observados en el muestreo de agosto de 2008 ($824,4 \pm 254,3 \text{ mg.ind}^{-1}$ y $65,6 \pm 5,7\%$), mientras los más bajos ($P<0,05$, ANOVA, SNK) fueron medidos en enero de 2008 para el contenido total de proteínas ($129,3 \pm 70,2 \text{ mg.ind}^{-1}$) y en marzo de 2009 para el %MO ($43,7 \pm 3,8\%$) (Figuras 4.7 y 4.8, Tabla 4.3).

Las hembras presentan una variación en relación al contenido total de proteínas (mg.ind^{-1}) desde el valor de $374,0 \pm 114,8 \text{ mg.ind}^{-1}$, observado en el mes de marzo de 2008, hasta el valor de $836,1 \pm 297,8 \text{ mg.ind}^{-1}$ en junio de 2009. El porcentaje de proteínas dentro de la materia orgánica presenta un promedio durante todo el estudio del $50,1 \pm 8,5\%$, variando desde los $38,0 \pm 3,9\%$ en el mes de diciembre de 2008 hasta los $62,2 \pm 3,1\%$ en el muestreo de abril de 2008 (Figuras 4.7 y 4.8, Tabla 4.4).

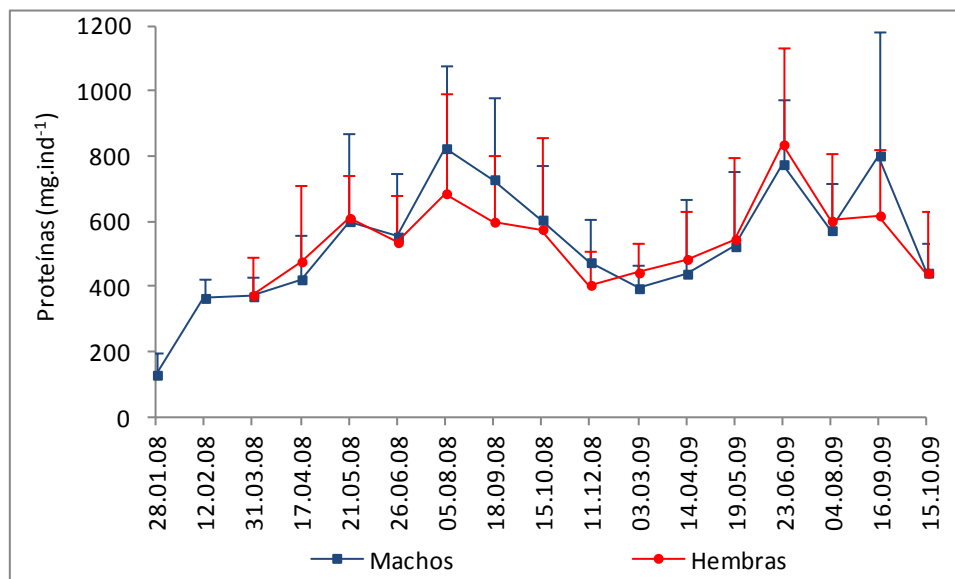


Figura 4.7. Evolución del contenido total de proteínas (mg.ind^{-1}) en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

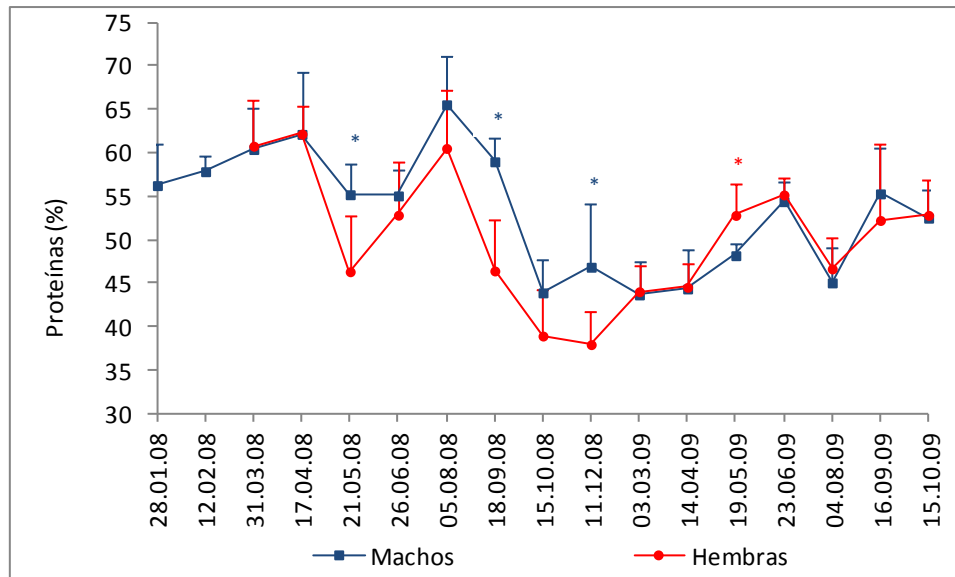


Figura 4.8. Evolución del porcentaje de proteínas dentro de la materia orgánica en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sexos ($P < 0,05$, ANOVA).

4.3.3.2.3. Carbohidratos

La evolución de los carbohidratos en los tejidos de la ostra *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa no presentaron diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA) entre los sexos, cuando comparados en relación al contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y en porcentaje dentro de la materia orgánica (Figuras 4.9 y 4.10).

Ambos sexos presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA) en la evolución de los carbohidratos en contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y en porcentaje dentro de la MO, dependiendo del mes de muestreo. En ambos sexos los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) del contenido total de carbohidratos ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y del %MO fueron observados en el muestreo de agosto de 2009, presentando los valores de $574,4 \pm 326,8 \text{ mg}\cdot\text{ind}^{-1}$ y $42,5 \pm 9,9\%$ para machos y $528,3 \pm 303,8 \text{ mg}\cdot\text{ind}^{-1}$ y $39,9 \pm 13,9\%$ para hembras (Figuras 4.9 y 4.10, Tablas 4.3 y 4.4).

Los machos presentaron los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en contenido total de carbohidratos y en %MO en el muestro de enero de 2008 ($22,6 \pm 24,9 \text{ mg}\cdot\text{ind}^{-1}$ y $7,9 \pm 3,7\%$), mientras las hembras registraron los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en marzo de 2008 para el contenido total ($149,7 \pm 95,4 \text{ mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y en los meses de mayo y septiembre de 2008 para el porcentaje dentro de la materia orgánica ($18,0 \pm 11,5\%$ y $17,7 \pm 9,9\%$, respectivamente).

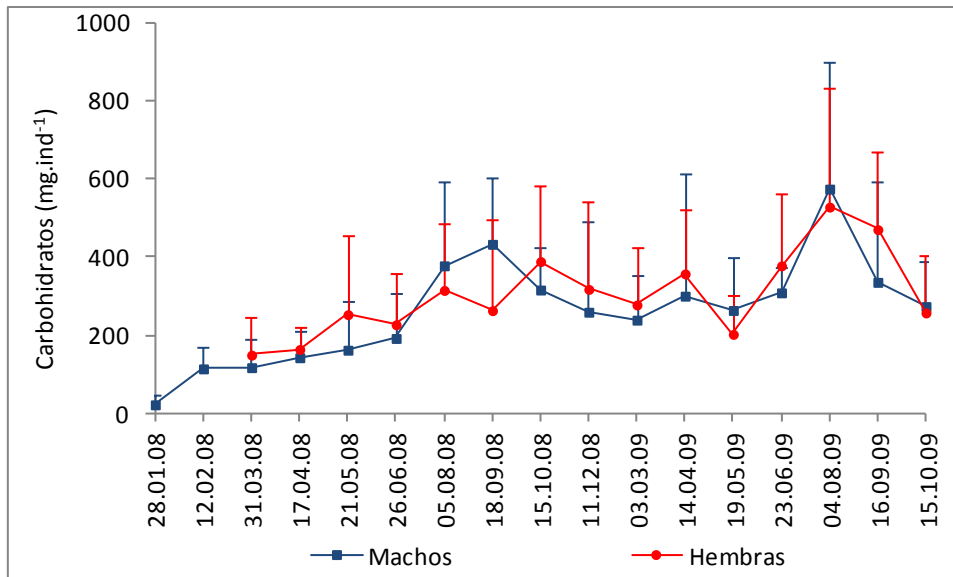


Figura 4.9. Evolución del contenido total de carbohidratos (mg.ind⁻¹) en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

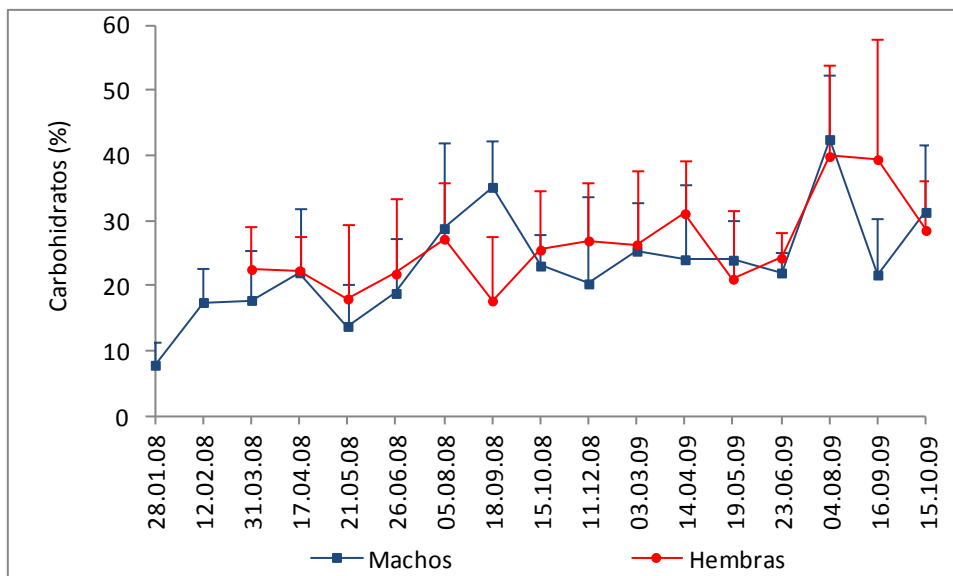


Figura 4.10. Evolución del porcentaje de carbohidratos dentro de la materia orgánica en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

4.3.3.2.4. Glucógeno

La evolución del glucógeno en contenido total (mg.ind⁻¹) y en porcentaje dentro de la MO (Figuras 4.11 y 4.12) presentan valores muy próximos entre sexos, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0,05$, ANOVA) entre los mismos. Sin embargo, cuando comparados mes a mes, se ha podido verificar una única diferencia significativa en el porcentaje

de glucógeno dentro de la materia orgánica, en el muestreo de diciembre, donde las hembras fueron significativamente superiores ($P < 0,05$, ANOVA).

Los valores de glucógeno en contenido total (mg.ind^{-1}) y en porcentaje dentro de la materia orgánica presentan diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA) entre los meses de muestreo en ambos sexos. Los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK), tanto en contenido total cuanto en %MO, en machos fueron observados en el muestreo de agosto de 2009 ($263,6 \pm 149,8 \text{ mg.ind}^{-1}$ y $19,5 \pm 4,7\%$), mientras los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron registrados en el muestreo de enero de 2008 ($9,5 \pm 8,3 \text{ mg.ind}^{-1}$ y $3,6 \pm 1,1\%$) (Figuras 4.11 y 4.12, Tabla 4. 3). Esta evolución en machos presenta la misma tendencia observada para los carbohidratos totales.

Las hembras presentan una evolución del glucógeno un poco distinta a la encontrada en los carbohidratos, donde los valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) del contenido total y del %MO fueron observados en el muestreo de octubre de 2008 ($325,0 \pm 214,5 \text{ mg.ind}^{-1}$ y $20,5 \pm 8,9\%$), mientras los más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron registrados en marzo de 2008 ($61,6 \pm 41,8 \text{ mg.ind}^{-1}$) para el contenido total y en mayo de 2008 para el %MO ($7,0 \pm 3,8\%$) (Figuras 4.11 y 4.12, Tabla 4.4).

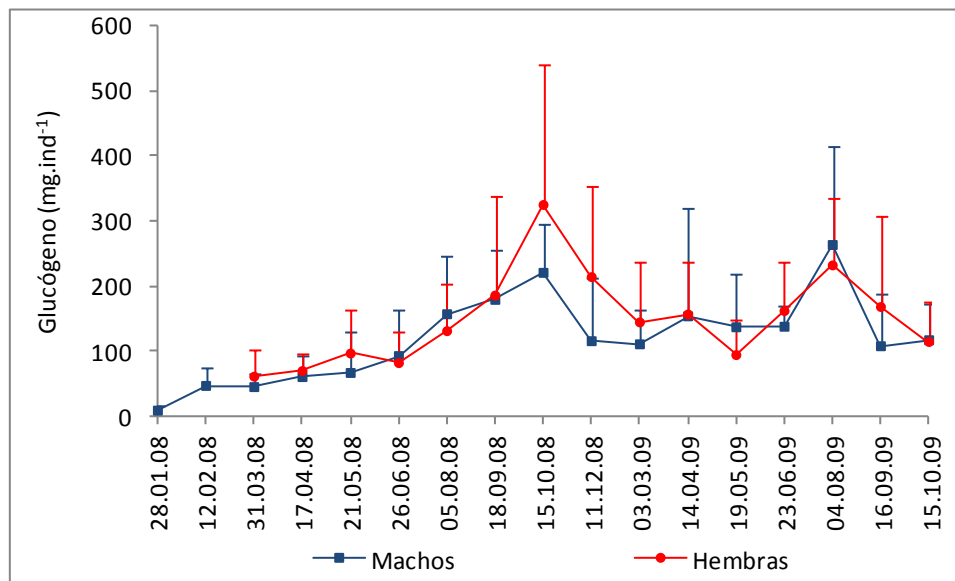


Figura 4.11. Evolución del contenido total de glucógeno (mg.ind^{-1}) en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

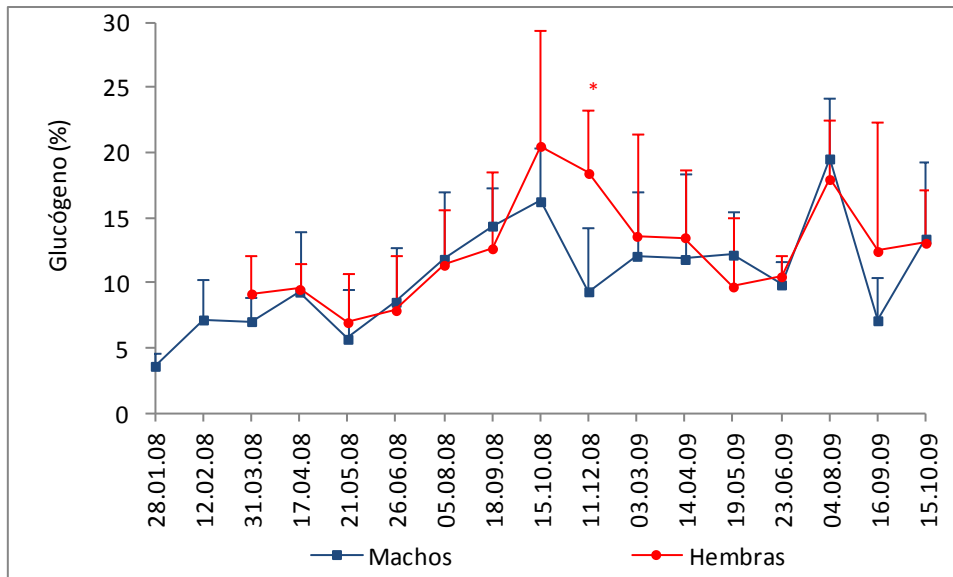


Figura 4.12. Evolución del porcentaje de glucógeno dentro de la materia orgánica en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

4.3.3.2.5. Lípidos

Los lípidos presentan valores en contenido total (mg.ind^{-1}) que no difieren significativamente entre los sexos ($P > 0,05$, ANOVA), sin embargo, los datos en porcentaje dentro de la materia orgánica son significativamente distintos ($P < 0,05$, ANOVA), con superioridad de las hembras en los muestreos de diciembre de 2008, abril, junio y septiembre de 2009 (Figura 4.13).

Cuando se evalúa el efecto del mes de muestreo sobre la evolución de los lípidos, los datos en contenido total y en porcentaje dentro de la materia orgánica son significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA) en ambos sexos (Figuras 4.13 y 4.14, Tablas 4.3 y 4.4).

En los machos, los valores en contenido total (mg.ind^{-1}) varían significativamente desde el valor mínimo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) observado en enero de 2008 ($40,6 \pm 35,5 \text{ mg.ind}^{-1}$) hasta el máximo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en septiembre de 2009 ($475,5 \pm 303,8 \text{ mg.ind}^{-1}$). Los valores del porcentaje de lípidos dentro de la materia orgánica presentan una evolución un poco distinta a los datos de contenido total, con valores que oscilan significativamente desde el mínimo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) registrado en abril de 2008 ($11,3 \pm 6,1\%$) hasta el máximo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) observado en septiembre de 2009 ($31,4 \pm 4,7\%$) (Figuras 4.13 y 4.14, Tabla 4.3).

En las hembras, los valores en contenido total (mg.ind^{-1}) y en porcentaje dentro de la materia orgánica presentan valores mínimos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en marzo de 2008 ($50,6 \pm 28,0 \text{ mg.ind}^{-1}$ y $8,4 \pm 4,1\%$) y máximos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en junio de 2009 para los

datos en contenido total ($542,1 \pm 234,2 \text{ mg.ind}^{-1}$) y septiembre de 2009 para los datos del %MO ($42,4 \pm 6,0\%$) (Figuras 4.13 y 4.14, Tabla 4.4).

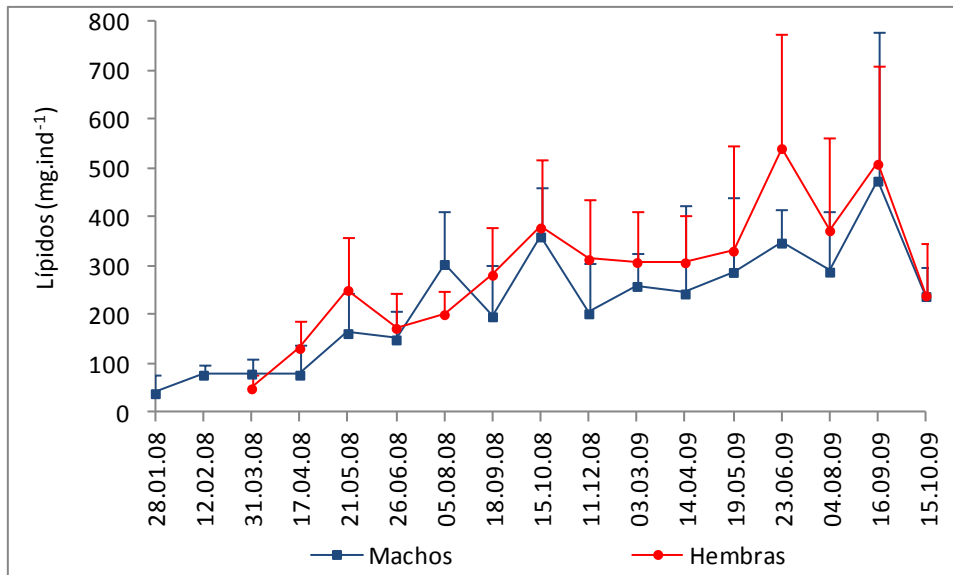


Figura 4.13. Evolución del contenido total de lípidos (mg.ind^{-1}) en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de.

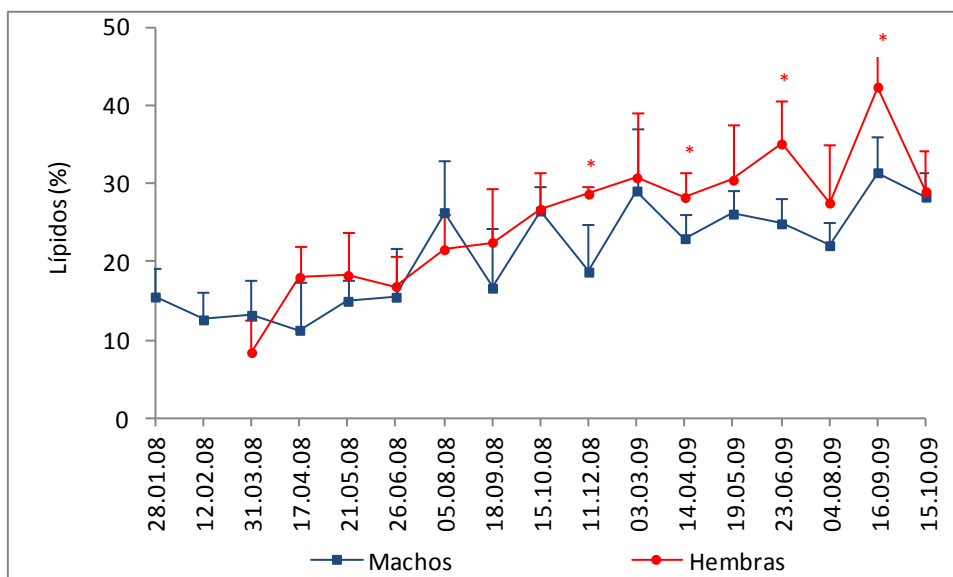


Figura 4.14. Evolución del porcentaje de lípidos dentro de la materia orgánica en machos y hembras de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa entre enero de 2008 y octubre de 2009. Valor medio \pm de. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sexos ($P < 0,05$, ANOVA).

4.3.4. Variables ambientales

La evolución de la temperatura y clorofila *a* están representadas en la figura 4.15, donde se puede observar un ciclo estacional evidente para la temperatura, con un incremento a partir

de la primavera alcanzando el máximo de 18,58 °C en julio de 2008 y 19,91 °C en julio de 2009. Posterior a este período, hay una disminución durante el otoño llegando al mínimo de 11,81 °C en 2008 y 13,55 °C en 2009.

La clorofila *a* presentó dos picos durante el año de 2008, uno en primavera (28/04) con 3,42 µg/l y el otro en otoño (22/09) con 3,10 µg/l. En el año de 2009, la evolución de la clorofila *a* fue distinta al año anterior, presentando valores elevados en finales de invierno, con 1,93 µg/l en 16/03 y durante toda la primavera. En principios de otoño (28/09) se ha observado, como en el año anterior, un pico con 2,76 µg/l de clorofila *a*.

La salinidad ha sido muy constante durante todo el periodo de estudio, presentando un valor medio de $34,55 \pm 1,30\%$.

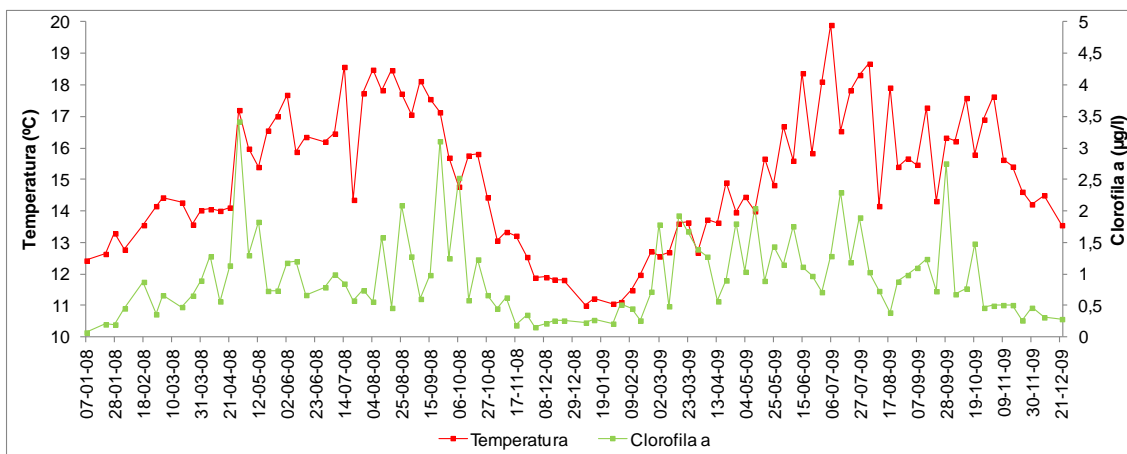


Figura 4.15. Evolución de los valores de temperatura y clorofila *a* en el Polígono A7 de O Grove, Ría de Arousa, durante el periodo de estudio.

4.4. DISCUSION

Varios estudios sobre los bivalvos marinos han demostrado que la madurez sexual está relacionada con el suministro de energía de las reservas previamente almacenadas o la ingestión de alimento disponible y por lo tanto su composición bioquímica está estrechamente correlacionada (Gabbott, 1975; Sastry, 1979; Navarro *et al.*, 1989; Pérez-Camacho *et al.*, 2003). El ciclo reproductivo traduce un patrón estacional de la composición bioquímica que puede variar entre poblaciones y especies (Albentosa *et al.*, 2007).

La ostra japonesa cultivada en Europa tiene un ciclo reproductivo, de una manera general, muy marcado, con el inicio de la gametogénesis en invierno, seguido de una fase de gametogénesis intensa en primavera, maduración y puesta en verano y un período de reabsorción en otoño (Fabioux *et al.*, 2005). Sin embargo, este modelo puede sufrir cambios dependiendo de la localidad y del sexo. En la ostra japonesa *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa, la gametogénesis, de una forma general, ocurre en invierno y primavera y las puestas se dan en verano y otoño. Por otra parte, si evaluamos el ciclo reproductivo en función de la diferenciación sexual, tenemos un ciclo mucho más definido y con algunas variaciones, con las hembras madurando desde diciembre hasta junio y presentando una puesta masiva entre el periodo de julio y octubre y los machos madurando desde diciembre hasta mayo con puestas parciales durante el período de mayo hasta diciembre con dos picos, uno en primavera y el otro en otoño, siendo el segundo pico más pronunciado.

La evolución del contenido en materia orgánica estuvo directamente relacionada al índice de condición y al índice de ocupación gonadal, donde las ostras tuvieron sus máximos valores en mayo del primer año para ambos sexos y en junio del segundo año para hembras y septiembre de 2009 para machos. La evolución del contenido en materia orgánica no presentó diferencias significativas entre los sexos. La relación entre el índice de condición y el índice de ocupación gonadal con la cantidad de la materia orgánica, nos indica cuando el organismo tiene una mayor cantidad de carne, componentes orgánicos y también de gametos, los que estarán relacionados a la variación bioquímica.

Con el progreso de la gametogénesis, la composición bioquímica sufre variaciones. Las cantidades totales de carbohidratos (del 22,6 al 551,4 mg.ind⁻¹), glucógeno (del 9,5 al 273 mg.ind⁻¹) y lípidos (del 40,6 al 492,8 mg.ind⁻¹) medidos en *Crassostrea gigas* en el presente estudio, presentan valores similares a los encontrados por Ruiz *et al.* (1992a) cultivando la misma especie en la Ría de Arousa, mientras los valores totales de proteínas (del 129,3 al 805,8 mg.ind⁻¹) son inferiores. En el presente capítulo hemos separado el análisis de los componentes principales por sexo, una vez que la composición bioquímica de los espermatozoides es distinta a la de los ovocitos, sin embargo no se han verificado diferencias significativas, con relación a la cantidad total (mg.ind⁻¹), entre los sexos.

Con relación al porcentaje de los componentes bioquímicos principales dentro de la materia orgánica (%MO), hemos verificado diferencias significativas entre los sexos en proteínas (machos del 43,7 al 65,6 %; hembras del 38,9 al 62,2 %) y lípidos (machos del 11,3 al 31,4 %; hembras del 8,4 al 42,4 %). Los mayores valores de lípidos presentes en las hembras, así como la superioridad de los machos en el porcentaje de proteínas, concuerdan con el obtenido por Soletchnik *et al.* (1997) en *Crassostrea gigas* cultivada en Francia.

El ciclo reproductivo de algunas poblaciones de *C. gigas* (Mann, 1979; Berthelin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003; Dridi *et al.*, 2007) de zonas templadas se caracteriza por la variación estacional de la composición bioquímica, donde el glucógeno acumulado durante el otoño y invierno es parcialmente utilizado como fuente de energía para la síntesis de lípidos, así como para sustentar la vitelogénesis y espermatogénesis (Parra *et al.*, 2005). En el presente capítulo se ha podido verificar un incremento de las cantidades de glucógeno total en machos y hembras durante el otoño de 2008, alcanzando los valores máximos de 220,9 y 325,0 mg.ind⁻¹, machos y hembras respectivamente, en octubre de 2008. Estas reservas de glucógeno acumuladas durante el otoño son movilizadas durante el invierno y primavera para sustentar la gametogénesis. Posteriormente se alcanzaron valores bajos durante finales de primavera y principios del verano cuando empiezan las primeras emisiones de gametos, y entonces aprovechando la disponibilidad de alimento presente en el medio (2,3 µg/l de clorofila *a* en julio de 2009) se acumulan valores elevados de glucógeno en agosto de 2009 para sostener la siguiente gametogénesis.

Normalmente, en moluscos bivalvos, se relaciona la reducción del contenido en glucógeno en los órganos de reserva con un aumento del contenido en lípidos en la gónada (Fernández-Reiriz *et al.*, 1996). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en pectínidos, en que el mayor aporte de glucógeno proviene del prominente músculo aductor, en ostras la fuente de glucógeno es principalmente el manto y los palpos labiales (Berthelin *et al.*, 2000). En el presente capítulo, los análisis bioquímicos se hicieron en una muestra representativa de todos los tejidos, por lo tanto no es posible determinar la transferencia de reservas entre ellos. Sin embargo, se ha podido verificar una relación inversa entre el contenido de glucógeno y el contenido de lípidos, de manera que, la vitelogénesis se produciría a expensas de las reservas de glucógeno almacenadas (Gabbott, 1975) a través de una serie de rutas de transformación como la glucólisis y lipogénesis.

Los lípidos son las fuentes de energía más eficientes, una vez que ofrecen mucho más energía metabólica que la misma cantidad de carbohidratos (glucógeno) o proteínas (Pogoda *et al.*, 2013). Los lípidos, en el presente capítulo, tienen un incremento constante hasta mayo de 2008, cuando el 100% de las hembras están maduras (estadio IIIA) y junio de 2009 cuando se alcanza la máxima maduración en este año (75%). Esta sincronía de acumulación de los lípidos en los ovocitos está estrechamente relacionada con el desarrollo ontogénico y el desempeño

larvario en *C. gigas* (Robinson, 1992 b, c; Massapina *et al.*, 1999; Uriarte *et al.*, 2004; Cannuel y Beninger, 2005).

Los lípidos totales, en hembras, también aumentaron inmediatamente después de la puesta. Estos resultados sugieren que, más que una consecuencia de la gametogénesis, el contenido total de lípidos también refleja el proceso de acumulación de energía y su consumo durante el desarrollo somático del bivalvo, tal como se ha descrito previamente por otros autores (Albentosa *et al.*, 2007; Joaquim *et al.*, 2008, Joaquim *et al.*, 2011).

Soudant *et al.* (1998) han constatado la existencia de diferencias en cuanto a la cantidad y composición de lípidos entre la gónada masculina y femenina, de manera que los lípidos en la gónada masculina se asocian fundamentalmente con funciones estructurales, como componentes de las membranas, mientras que en la gónada femenina, son utilizados tanto como sustancias estructurales como de reserva. Las cantidades totales de lípidos ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) no presentaron diferencias significativas entre los sexos, sin embargo los datos del porcentaje de lípidos dentro de la materia orgánica fueron significativamente superiores en las hembras llegando al momento de mayor maduración de 2009 con valores del 35,1% frente a los 24,9% registrado en los machos.

Algunos autores han sugerido que las proteínas se utilizan como reserva de energía en situaciones de estrés nutricional y balance energético negativo o durante la maduración gonadal (Gabbott y Bayne, 1973; Liu *et al.*, 2008). En nuestro estudio, los valores máximos de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) fueron observados en los muestreos de agosto de 2008 y junio de 2009. Este incremento del contenido total de proteínas presenta una sincronía con la talla media de los ovocitos durante la maduración. Esta sincronía ya había sido descrita en *Crassostrea gigas* cultivada en Japón por Li *et al.* (2000) y en Nueva Zelanda por Ren *et al.* (2003). Para Suzuki *et al.* (1992) las proteínas presentes en la gónada de hembras se acumulan en forma de una vitelina que se asocia a los lípidos, por eso, esta vitelina aislada ha sido identificada como una glucolipoproteína. Las lipoproteínas que transportan lípidos a la gónada son vitelogeninas, y al proceso de transporte y acumulación en gónadas se le conoce como vitelogénesis. Las vitelogeninas además de transportar lípidos, transportan otros nutrientes, como proteínas, carbohidratos y pigmentos hacia los ovocitos que se encuentran en las gónadas durante la maduración. Cuando las vitelogeninas entran en los ovocitos por endocitosis, se acumulan en forma de vitelo.

En *C. gigas* se ha observado que la concentración de proteínas aumenta durante los estadios más avanzados de maduración, para luego disminuir durante los desoves en el verano y otoño (Deslous-Paoli y Héral, 1988; Ruiz *et al.*; 1992a; Ren *et al.*, 2003; Dridi *et al.*, 2007). Este patrón de acumulación y movilización de las proteínas también se observó en machos y hembras de *Crassostrea gigas* cultivada en la Ría de Arousa en el presente estudio.

Por otra parte, también se han sugerido que algunas especies utilizan las proteínas como fuente de energía de mantenimiento cuando las reservas de carbohidratos ya se han agotado (Albentosa *et al.*, 2007; Joaquim *et al.*, 2011). En nuestro caso, los valores totales de carbohidratos y proteínas (mg.ind^{-1}), presentan una disminución durante el otoño e invierno, que puede estar relacionada al estrés causado por la escasez del alimento y la bajada de temperatura en esta época del año (Beninger y Lucas, 1984; Whyte *et al.*, 1990; Ruiz *et al.*, 1992a).

Las proteínas fueron los componentes mayoritarios en relación a la materia orgánica, presentando valores que varían en machos del 43,7 al 65,6 % y en hembras del 38,9 al 62,2 %, por lo tanto es importante en la dieta de los reproductores que influyen sobre la maduración y eventualmente sobre la calidad de los desoves y el desarrollo larvario (Massapina *et al.*, 1999).

Sobre la composición bioquímica general de la ostra *C. gigas* cultivada en Europa, lo que se encuentra en los trabajos publicados es que las ostras siguen un patrón de organismos conservativos en años con bajas cantidades de alimento y de oportunistas en años con gran cantidad de alimento (Ruiz *et al.*, 1992; Berthelin *et al.*, 2001). En el presente estudio las ostras presentan patrones distintos en relación al sexo y al año de estudio, una vez que tuvimos picos de alimento diferentes en los dos años. En 2008, la evolución de la clorofila *a* presenta dos picos muy marcados, uno en primavera con 3,42 $\mu\text{g/l}$ y el otro en otoño con 3,10 $\mu\text{g/l}$. Sin embargo en 2009, la evolución de la clorofila *a* fue distinta al año anterior, presentando valores moderados en finales de invierno y durante toda la primavera, y un pico de 2,76 $\mu\text{g/l}$ en principios de otoño. Con eso, se puede decir que las ostras, tanto machos como hembras, actuarían como conservativas durante la primera gametogénesis, sin embargo los machos tendrían un comportamiento de oportunista durante el segundo pico de puesta realizado en otoño, aprovechando el segundo afloramiento fitoplanctónico, para acumular lípidos y proteínas antes de la emisión de los gametos.

4.5. CONCLUSIONES

- La evolución de los componentes bioquímicos en cantidad total (mg.ind^{-1}) no presenta diferencia significativa entre los sexos.
- Los machos presentan menor porcentaje de lípidos y mayor porcentaje de proteínas que las hembras, durante el ciclo gonadal.
- Las reservas de glucógeno acumuladas durante el otoño son movilizadas durante el invierno y primavera para sustentar la gametogénesis.
- Hay una relación inversa entre el contenido de glucógeno y el contenido de lípidos, de manera que la vitelogénesis se produce a expensas de las reservas de glucógeno almacenadas.
- La acumulación de los lípidos presenta una sincronía con la maduración sexual, alcanzando los máximos valores en los momentos de mayor maduración gonadal.
- El incremento de lípidos en hembras, después del periodo de puesta, puede estar relacionado con el proceso de acumulación de energía y su consumo durante el desarrollo somático.
- Las proteínas son los componentes bioquímicos mayoritarios dentro de la materia orgánica y su evolución en contenido total presenta una sincronía con el desarrollo de los ovocitos, alcanzando los valores máximos de diámetro ovocitáreo en los meses de máximos valores de proteínas.
- La ostra japonesa *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa presenta un comportamiento conservativo en el primer ciclo gametogénico en machos y en hembras, mientras los machos presentan un comportamiento oportunista durante el segundo ciclo gametogénico en ambos años de estudio.

**5. EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA BIOLOGÍA
REPRODUCTIVA DE *Crassostrea gigas* EN LA RÍA DE
AROUSA**

EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Crassostrea gigas* EN LA RÍA DE AROUSA

5.1. INTRODUCCIÓN

El estudio del desarrollo gonadal de ostras cultivadas en ambiente natural ya ha sido reportado por diversos trabajos en muchos países (Massapina *et al.*, 1999; Steele y Mulcahy, 1999; Galvão *et al.*, 2000; Berthelin *et al.*, 2001; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Castaños *et al.*, 2009), sin embargo en España, los datos del desarrollo gonadal de la ostra japonesa *C. gigas* en ambiente natural son muy escasos (Ruiz *et al.*, 1992a).

Existen factores endógenos y exógenos que afectan el desarrollo gonadal de las ostras. Dentro de los factores endógenos hay que destacar las variaciones de los componentes bioquímicos que están asociados a complejos ciclos de almacenamiento de reservas (Sastry, 1979); las neurohormonas que son los principales mensajeros implicados en la reproducción de bivalvos marinos (Ketata *et al.*, 2007) y la edad, una vez que la especie *C. gigas* es considerada hermafrodita sucesiva protándrica irregular, desarrollando normalmente en el primer ciclo gonadal gametos masculinos (Guo *et al.*, 1998). Entre los factores exógenos estudiados, los que presentan mayor influencia sobre la reproducción de moluscos bivalvos son la temperatura, el alimento disponible, la salinidad y el fotoperiodo (Mann, 1979; Muranaka y Lannan, 1984; Robinson, 1992b, c; Ruiz *et al.*, 1992a; Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Otros factores exógenos que pueden afectar el desarrollo gonadal son los sistemas de cultivo, una vez que en los mismos son modificadas la densidad de cultivo de los organismos lo que conlleva a una mayor competencia por el alimento.

La influencia de la técnica utilizada para mantener las ostras en cultivo se basa principalmente en la diferencia que ambos sistemas proporcionan en el desarrollo de las ostras. Son limitados los registros en la literatura de trabajos que comparan sistemas de cultivo y evalúan paralelamente el desarrollo gonadal de las ostras cultivadas. Un ejemplo que se acerca al propuesto por el presente capítulo, es el trabajo de Mason y Nell (1995) que hacen un comparativo de la evolución del índice de condición y de la composición química de ostras *Crassostrea gigas* y *Saccostrea commercialis* cultivadas en batea y en sistema intermareal, donde lo que cambia básicamente es el tiempo de permanencia de las ostras dentro del agua. Otro trabajo relacionado con la temática del presente capítulo es el de Chávez-Villalba *et al.* (2010) que cultivaron la ostra japonesa *C. gigas* dentro y fuera de una laguna en México, comparando densidades de cultivo y obtuvieron diferencias inversamente proporcionales de los valores del índice de condición con la densidad utilizada.

En el presente capítulo se ha hecho un análisis cualitativo y cuantitativo del desarrollo gonadal de la ostra japonesa *C. gigas*, añadiendo una nueva información que es la influencia del sistema de cultivo sobre el ciclo reproductivo. Para esto se utilizaron los dos sistemas principales de cultivo de ostras en España, el de jaulas y el de cuerdas utilizado desde hace muchos años en el cultivo de la ostra plana *Ostrea edulis*.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Área de estudio y muestreo

El estudio de la biología reproductiva se llevó a cabo con ostras traídas de la Bahía de Arcachon (Francia) en el mes de marzo de 2008 y cultivadas en batea durante el periodo de abril de 2008 hasta octubre de 2009 bajo dos sistemas de cultivo. Los sistemas utilizados fueron los de jaulas patentadas por el IEO y lo de cuerdas. Las jaulas son estructuras cilíndricas compuestas por bandejas plásticas circulares envueltas por una malla externa. Se utilizaron en cada jaula 6 bandejas circulares (con un diámetro de 0,36 m, altura de 0,15 m y una superficie de 0,1 m²) recubiertas por una malla de 10 mm. La densidad utilizada en el sistema de jaula fue de 100 ostras/bandeja, lo que supone un número de 1000 ostras por metro cuadrado. La cuerda es un sistema tradicional utilizado para el cultivo de la ostra plana *Ostrea edulis*. En el presente trabajo se hicieron cuerdas de 6 metros de largo con ostras pegadas con cemento en grupos de 4, con una distancia media de 15-20 cm entre grupos, totalizando 150 ostras por cuerda.

Para este estudio, se recogieron muestras de 40 ostras con intervalos de aproximadamente un mes, durante el período de abril de 2008 hasta octubre de 2009. Una vez recogidas, las ostras fueron conducidas hasta el Centro Oceanográfico da Coruña del Instituto Español de Oceanografía (IEO), donde se realizaron los muestreos. En estos muestreos, cada ostra fue medida (longitud y anchura) con un calibre con una precisión de 0,1 mm y pesada (peso total, peso fresco de las valvas y peso fresco de las partes blandas) utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Para el peso fresco de las partes blandas, éstas se dejaron en papel absorbente, para retirar el exceso de agua, antes de proceder el pesaje.

5.2.2. Índice de Condición

Para la determinación del Índice de Condición, se utilizó la expresión descrita por Walne y Mann (1975), la cual se calcula como:

$$IC = (P1 \times 1000)/P2$$

Donde P1 es el peso seco liofilizado de las partes blandas de 10 ostras y P2 es el peso seco de las valvas de las mismas 10 ostras.

Las partes blandas de 10 ostras (5 machos y 5 hembras) fueron liofilizadas por 48 h en un liofilizador para un posterior análisis bioquímico (datos presentados en el capítulo 6). Las valvas de estas mismas 10 ostras fueron puestas en recipientes tarados y se secaron en estufa a 40 °C hasta alcanzar peso constante.

5.2.3. Análisis histológico

Los estadios de maduración se establecieron a través del análisis histológico del tejido gonadal de 10-15 ostras por muestreo (5 machos y 5 hembras). Para ello, se fijó en líquido de Bouin durante 24 horas la sección de carne comprendida entre los palpos labiales y la cavidad pericárdica. Esta sección se conservó en alcohol 70°, para su posterior deshidratación mediante baños sucesivos en alcohol de diferente gradación. La eliminación de los restos de alcohol se realizó en un medio soluble en parafina (xileno) y posteriormente se incluyeron en parafina (Bayer (55 – 57 °C)) (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Protocolo de deshidratación e inclusión en parafina.

Reactivo	Tiempo de inmersión
Alcohol 70°	Hasta eliminar restos del fijador
Alcohol 96°	Una hora
Alcohol 96°	Una hora
Alcohol 100°	Dos horas
Alcohol 100°	Una hora
Xileno	Una hora
Xileno	Una hora
Parafina líquida (60 °C)	Una hora
Parafina líquida (60 °C)	Una hora

Los bloques de parafina, mantenidos a 4 °C, fueron cortados a dos profundidades, en secciones de 5 µm. Las secciones resultantes se estiraron en un baño de agua destilada a 45 °C, se recogieron en un portaobjetos (dos secciones por portaobjetos) y se secaron al aire.

El siguiente paso consistió en el desparafinado de las secciones dispuestas en el portaobjetos y la tinción. Los portaobjetos se tiñeron con la tinción tricrómica propuesta por Wheatley (1951) modificada (Tabla 5.2), utilizando el kit comercial Para-Park Trichrome Stain. Posteriormente se procedió al montaje con medio sintético (DPX).

Tabla 5.2. Protocolo de tinción tricrómica propuesta por Wheatley (1951) modificado.

Reactivo	Tiempo de inmersión
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Tinción tricrómica	Dos inmersiones
Solución B*	Aproximadamente 1 minuto
Alcohol 96°	1 minuto
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Xileno	5 minutos

* Solución B = 995 ml de alcohol 90° y 5 ml de ácido acético glacial.

Para cada individuo se analizaron, utilizando un microscopio, dos portaobjetos conteniendo en cada uno de ellos dos secciones de la ostra. Cada portaobjetos corresponde a una profundidad diferente del cuerpo del animal, garantizando la representatividad de los datos respecto al total de la gónada.

La determinación de los estadios de desarrollo gonadal se realizó utilizando la escala descrita por Lubet (1959), con una modificación, donde se agruparon los estadios IIIA1 y IIIA2 en un único estadio IIIA (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Escala de desarrollo gonadal de Lubet (1959) modificada y su descripción.

Estadio	Descripción
0 (reposo sexual)	Los folículos se comprimen, sólo subsisten las células madres de las gonias, espermatogonias y ovogonias, elementos sobre los que se desarrollará la gónada. La diferenciación de machos y hembras se realiza en base a las características de las espermatogonias y ovogonias
I (multiplicación de las gonias)	Las células germinales en reposo se activan y se produce un cambio de volumen y morfología nuclear. Se encuentran diferentes estados de desarrollo: células madres, espermatogonias y espermatocitos en machos y células madres, ovogonias y ovocitos previtelogénicos en hembras.
II (gametogénesis)	La foliculogénesis y gametogénesis son intensas, llegando a aparecer los primeros gametos maduros (espermatozoides y ovocitos).
IIIA (maduración)	Período donde los gametos maduran, estando al final de esta fase aptos para ser liberados al medio ambiente.
IIIB (puesta – vaciado total o parcial)	Una vez alcanzada la maduración tienen lugar las primeras liberaciones de gametos que llenan los gonoductos, dejando espacios intrafolículos.
IIIC (restauración entre puestas sucesivas)	El tamaño de los folículos disminuye, teniendo la apariencia de comprimidos. El número de células en desarrollo aumenta, mientras los gametos maduros disminuyen.
IIID (fin de la estación de reproducción)	Después de la última puesta de la estación, los folículos son pequeños y están prácticamente vacíos, restando unos pocos gametos maduros (ovocitos o espermatozoides), con señales de citolisis. Los folículos son invadidos internamente y externamente por hemocitos, con probable función degenerativa.

La proporción sexual (sex-ratio), establecida como la relación del número total de machos y hembras, se comparó en cada muestreo así como el promedio total durante el periodo de estudio, aplicándose el test no paramétrico del χ^2 con un nivel de significancia $\alpha = 5,0\%$.

La época de puesta fue evaluada a través de la distribución de frecuencia mensual de los diferentes estadios de maduración en relación al índice de condición y al índice de ocupación gonadal.

5.2.4. Análisis de imagen

Para el análisis de imagen, se hicieron al azar, dentro del área gonadal, una imagen por sección, como matriz de píxeles, con una cámara digital modelo acoplada al microscopio, tomando un total de cuatro imágenes por individuo con un aumento de 200x.

Cada imagen se analizó utilizando el programa MICROIMAGE determinando el índice de ocupación gonadal (IOG) en ambos sexos.

El índice de ocupación gonadal descrito por Delgado y Pérez Camacho (2003), se define como el porcentaje del área analizado que está ocupado por gametos y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{IOG} = (\text{área ocupada por gametos} / \text{área del campo analizado}) \times 100$$

La determinación del IOG en el caso de los machos está basada en la distinción cromática producida por la tinción utilizada, que permite agrupar los gametos y medir el área ocupada, mientras que en el caso de las hembras se realizó un conteo y medición automático, seleccionando los objetos por rango de color y tamaño, determinándose el área y diámetro máximo de cada ovocito. Después de la primera selección, se realiza una supervisión y corrección de los posibles errores del modo automático, de forma manual. Sumándose el área de todos los ovocitos por imagen se obtiene el área ocupada por los gametos. En ambos casos el área de la imagen es de 140000 μm^2 .

5.2.5. Variables ambientales

Los datos de temperatura y salinidad en la columna de agua a una profundidad de 0-5 metros, fueron obtenidos, por una sonda CTD Sea-Bird 25. Los datos de clorofila *a* fueron obtenidos por el filtrado a presión constante de un volumen de 100 mL de agua a una profundidad de 0-5 metros, separando las partículas en dos clases $>2,7\mu\text{m}$ y $<2,7\mu\text{m}$, las cuales fueron sumadas para representar el dato de clorofila *a*. La extracción de la clorofila *a* presente en los filtros de fibra de vidrio realizase en acetona al 90% resfriada y en oscuridad por no menos que 14 horas. Posteriormente se analizan por espectrofotometría por medio de una ecuación tricromática, siguiendo el método de Neveux y Panouse (1987). Todos los datos fueron obtenidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia, en una estación meteorológica ubicada cercana a la bodega de cultivo en el polígono A7 de O Grove. Estos datos fueron proporcionados por el INTECMAR en el marco de un convenio entre éste y el IEO para la toma de datos oceanográficos en las Rías Gallegas.

5.2.6. Presentación de los datos y análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Plus 5.1.

Para todos los datos se analizó la normalidad mediante el test de Kolgomorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, cuando presentaban el mismo número de datos, y de Bartlett cuando presentaban un número distinto. Cuando los datos eran normales y las varianzas homogéneas se realizó el test *t* de Student o el Análisis de Varianza Simple (ANOVA) y en los casos en que los datos no se adecuaban a la distribución normal o las varianzas no fueran homogéneas se utilizó el test de Mann-Whitney o el Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis. Para los tests a posteriori se utilizaron el test de Student-Newman-Keuls (SNK) para los datos analizados por ANOVA y el test Mann-Whitney, comparando datos pareados, cuando los datos seguían una distribución no paramétrica. En todos los casos se utilizó un α de 5%.

Los datos del IOG se transformaron utilizando la transformación arcoseno.

Para verificar la relación e influencia de las variables ambientales sobre el índice de ocupación gonadal (IOG) e índice de condición (IC) se realizaron análisis de regresión múltiples obteniéndose los valores de r^2 de los modelos, así como los Coeficientes de Correlación de Pearson.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Proporción sexual (*sex-ratio*)

Se muestrearon un total de 335 ostras para el sistema de jaulas y 402 ostras para el sistema de cuerdas. En el sistema de jaulas 41,19% fueron machos, 24,18% hembras, 25,67% indeterminadas y 8,96% hermafroditas simultáneos. La evolución de la proporción de los sexos en el sistema de jaulas está representada en la figura 5.1.

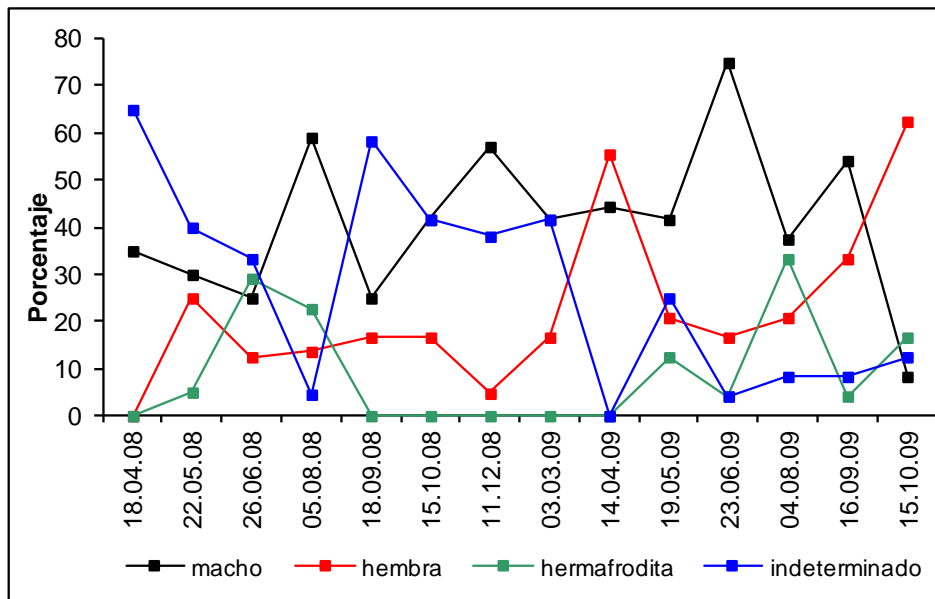


Figura 5.1. Evolución de la proporción sexual de *Crassostrea gigas* cultivada en jaulas en la Ría de Arousa.

La proporción sexual (machos:hembras) durante todo el período de estudio, en el sistema de jaulas, fue de 1,70:1. De acuerdo con el test del χ^2 la proporción de machos es significativamente mayor que la de hembras cuando se analiza el promedio total durante el periodo de estudio. En el análisis mensual, la proporción de machos fue significativamente superior en los muestreos de agosto de 2008 (4,33:1), diciembre de 2008 (12,00:1) y junio de 2009 (4,50:1), mientras las hembras presentaron una proporción superior en el muestreo de octubre de 2009 (1:7,50).

En el sistema de cuerdas 36,32% fueron machos, 47,26% hembras, 7,46% indeterminadas y 8,96% hermafroditas simultáneos. La evolución de la proporción de los sexos en el sistema de cuerdas está representada en la figura 5.2.

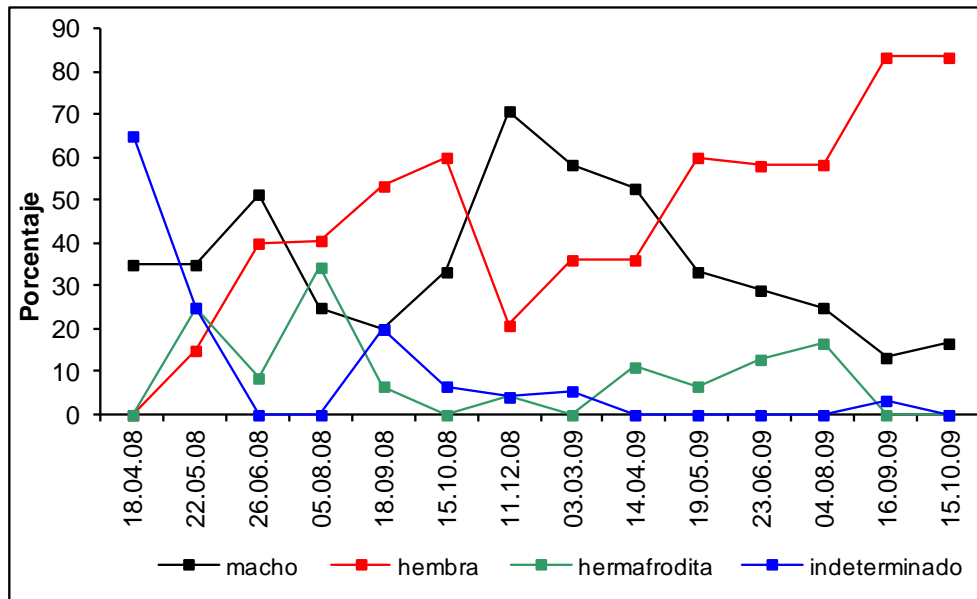


Figura 5.2. Evolución de la proporción sexual de *Crassostrea gigas* cultivada en cuerdas en la Ría de Arousa.

La proporción sexual (machos:hembras) durante todo el período de estudio, en el sistema de cuerdas, fue de 0,77:1. De acuerdo con el test del χ^2 la proporción de machos es significativamente inferior que la de hembras cuando se analiza el promedio total durante el periodo de estudio. En el análisis mensual, la proporción de machos fue significativamente superior en el muestreo de diciembre de 2008 (3,40:1), mientras las hembras presentaron una proporción superior en los muestreos de septiembre de 2008 (1:2,67), septiembre de 2009 (1:6,25) y octubre de 2009 (1:5,00)

5.3.2. Índice de Condición (IC)

La evolución del índice de condición en las ostras cultivadas bajo los sistemas de jaulas y cuerdas está representada en la figura 5.3. Evaluando la evolución de los datos del IC de las ostras cultivadas se ha podido verificar una superioridad significativa del sistema de cuerdas durante todos los meses de cultivo ($P < 0,05$, test t de Student).

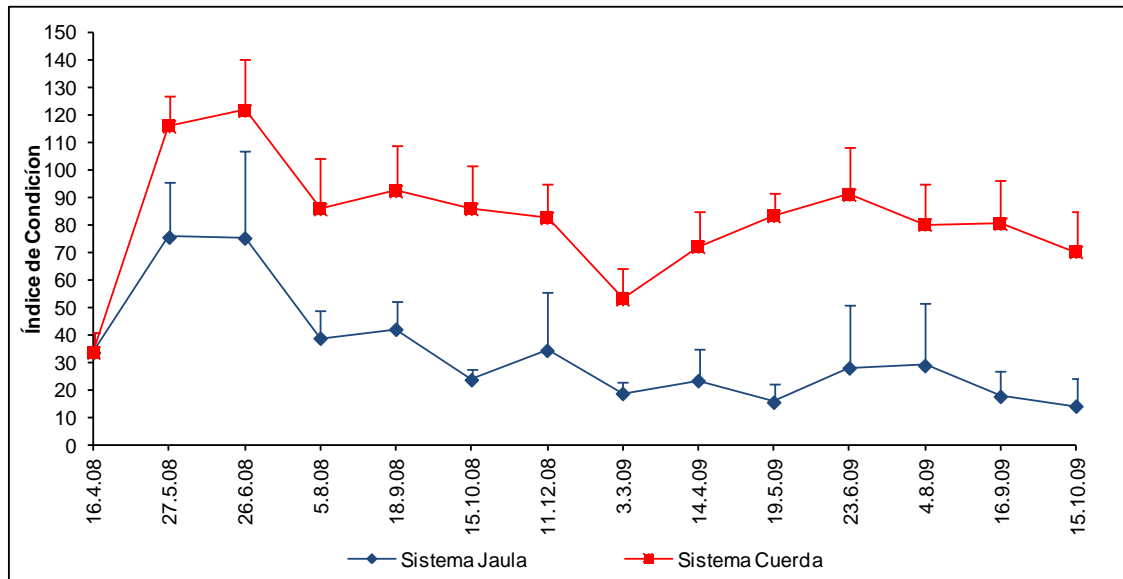


Figura 5.3. Evolución del Índice de Condición para ostras de la especie *C. gigas* cultivadas en jaulas (dato medio + de) y en cuerdas (dato medio + de) en la Ría de Arousa.

En el 1º año del cultivo ocurre, en las ostras mantenidas en jaulas, un crecimiento significativo entre los meses de abril y mayo ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), alcanzando el máximo valor medio de $75,70 \pm 19,93$. Este valor elevado se mantiene sin variación significativa entre mayo y junio ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), sin embargo entre el mes de junio y agosto ocurre una bajada significativa de los valores del IC ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney).

Durante el segundo año de cultivo (2009) las ostras no incrementan sus valores de IC como ha ocurrido en el primer año. Sin embargo hay un crecimiento significativo entre mayo y agosto ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) seguido de una bajada significativa entre agosto y octubre ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney).

El sistema de cuerdas presenta una evolución semejante al sistema de jaulas, sin embargo con valores significativamente más altos durante todo el periodo de cultivo ($P < 0,05$, test *t* de Student). Durante el primer año, las ostras cultivadas en cuerdas incrementan significativamente sus valores de IC durante la primavera llegando a valores máximos de $121,80 \pm 18,57$ en el mes de junio. Entre los meses de junio y agosto ocurre una bajada significativa de $121,80 \pm 18,57$ para $85,91 \pm 18,16$, lo que puede representar un periodo de puesta. Pasado este periodo los valores se mantienen elevados durante todo el otoño, bajando significativamente en invierno entre diciembre y marzo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK).

Durante el segundo año de estudio ocurre un incremento significativo durante la primavera ($P < 0,05$, ANOVA, SNK), alcanzando los valores máximos en el mes de junio ($91,18 \pm 16,89$), como ha ocurrido en el primer año. Los datos disminuyen entre los meses de junio y agosto pero no significativamente ($P > 0,05$, ANOVA, SNK).

5.3.3. Índice de Ocupación gonadal (IOG)

En la figura 5.4 se representa la evolución del IOG para las ostras cultivadas en los sistemas de jaulas y cuerdas. Cuando comparamos la evolución del IOG en los diferentes sistemas de cultivo, podemos observar que el sistema de jaulas presenta valores inferiores al sistema de cuerdas durante todo el cultivo con excepción del muestreo de diciembre. Sin embargo, los valores del IOG son significativamente inferiores solamente en los muestreos de junio y agosto de 2008 y agosto de 2009 ($P < 0,05$, test t de Student).

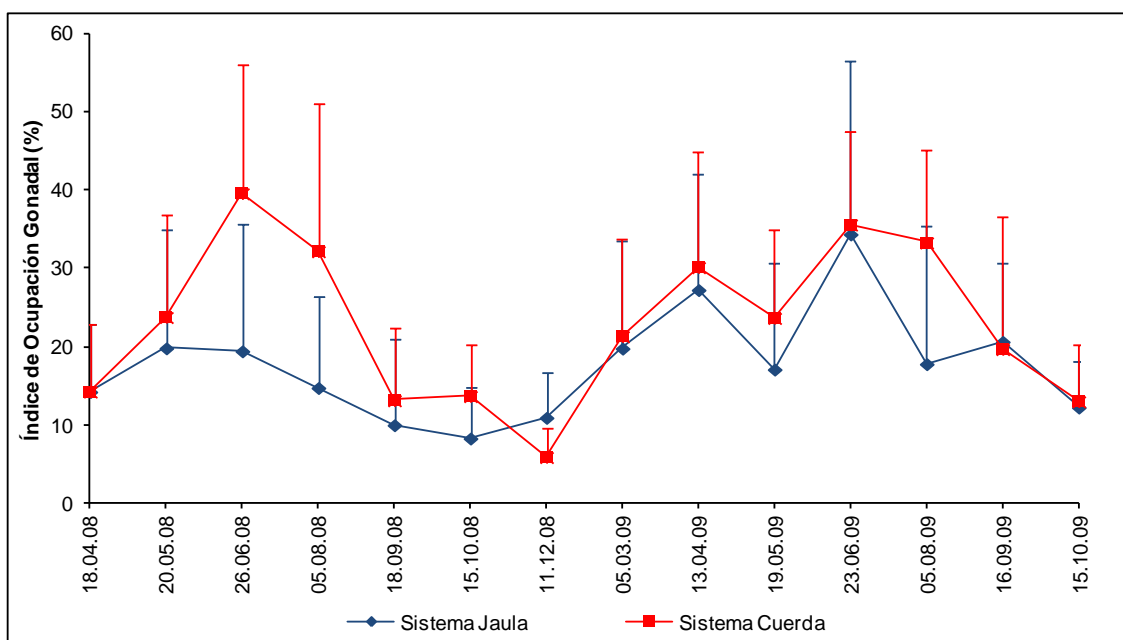


Figura 5.4. Evolución del Índice de Ocupación Gonadal para ostras de la especie *C. gigas* cultivadas en jaulas (dato medio + de) y en cuerdas (dato medio + de) en la Ría de Arousa.

Los valores del IOG en ambos sistemas de cultivo aumentan conforme avanza el período reproductivo, alcanzando su máximo en primavera, en el muestreo de mayo de 2008 para las ostras cultivadas en jaulas, con los valores de $19,84 \pm 15,11\%$ y en junio de 2008 para las ostras cultivadas en cuerdas con $39,57 \pm 16,43\%$. Durante el segundo año de cultivo ocurre la misma tendencia de crecimiento, con los valores máximos del IOG registrados en el mes de junio para ambos sistemas ($34,38 \pm 22,12\%$ y $35,59 \pm 11,86\%$, jaulas y cuerdas respectivamente).

Las ostras cultivadas en jaulas sufren una disminución del IOG no significativa entre los meses de junio y agosto de 2008 ($P > 0,05$, ANOVA, SNK). Esta tendencia es mantenida en los siguientes meses, hasta alcanzar su valor mínimo en el mes de octubre de 2008 ($8,34 \pm 6,46\%$). Las ostras cultivadas en cuerdas presentan también una disminución no significativa entre los meses de junio y agosto de 2008 ($P > 0,05$, ANOVA, SNK), sin embargo en el mes siguiente

(septiembre) se registra un valor medio de $13,16 \pm 9,24\%$, significativamente inferior al mes anterior ($P < 0,05$, ANOVA, SNK).

Durante el segundo año, las ostras cultivadas en ambos sistemas presentan un incremento significativo de sus valores hasta el muestreo de junio ($P < 0,05$, ANOVA, SNK), ocurriendo en seguida, entre los meses de junio y agosto, una disminución no significativa de los valores del IOG de las ostras cultivadas en ambos sistemas de cultivo ($P > 0,05$, ANOVA, SNK).

Cuando comparamos la evolución del IOG entre los sexos podemos verificar una superioridad significativa de los machos en ambos sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Mann-Whitney). En el sistema de jaulas se puede verificar una superioridad significativa de los machos en los meses mayo y octubre de 2008 y abril, junio, agosto y septiembre de 2009 ($P < 0,05$, test t de Student) (Figura 5.5).

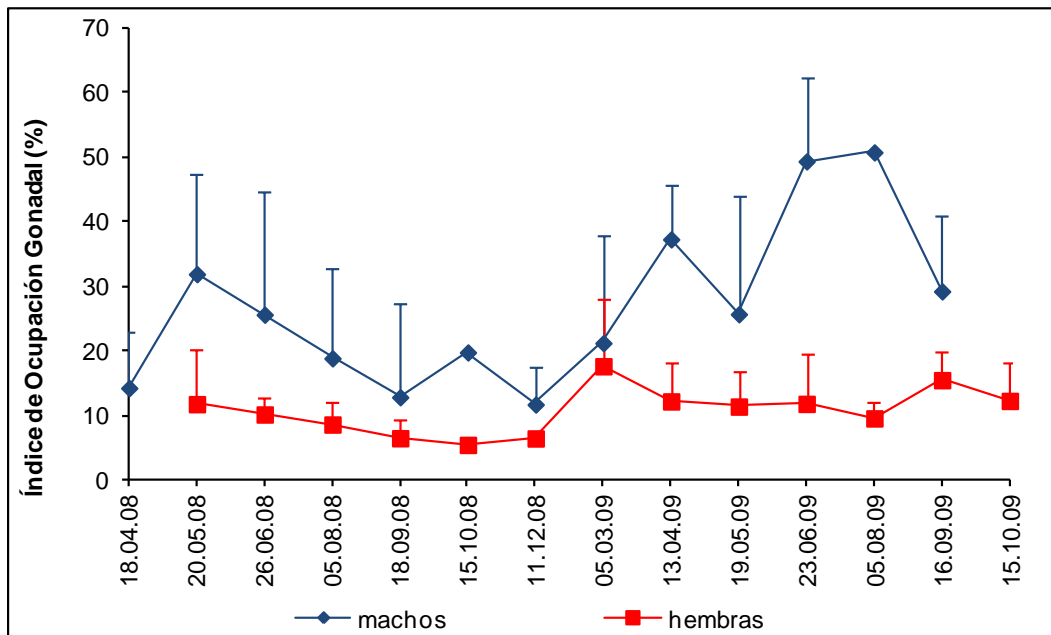


Figura 5.5. Evolución del Índice de Ocupación Gonadal para machos y hembras de la especie *C. gigas* cultivadas en jaulas (dato medio + de) en la Ría de Arousa.

En el sistema de cuerdas, los valores del IOG obtenidos durante el primer año de estudio no difirieron significativamente ($P > 0,05$, test t de Student), con una única excepción en el mes de septiembre donde los datos del IOG de los machos fueron significativamente superiores ($P < 0,05$, test t de Student). Durante el segundo año de estudio los machos presentaron valores del IOG significativamente superiores a hembras en todos los muestreos ($P < 0,05$, test t de Student) con excepción del mes de abril donde los datos no difirieron significativamente ($P > 0,05$, test t de Student) (Figura 5.6).

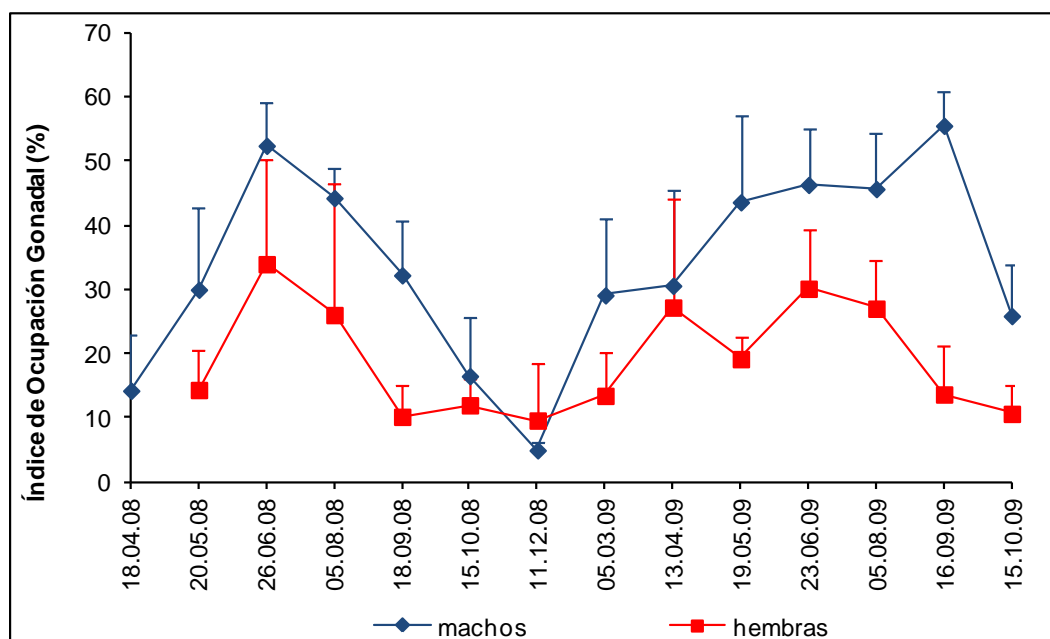


Figura 5.6. Evolución del Índice de Ocupación Gonadal para machos y hembras de la especie *C. gigas* cultivadas en cuerdas (dato medio + de) en la Ría de Arousa.

5.3.4. Estadios de desarrollo gonadal

5.3.4.1. Sistema de Jaulas

Las ostras cultivadas en el sistema de jaulas presentaron una evolución distinta entre los sexos. Los machos empezaron el cultivo con un 85,7% de individuos en el estadio II, pasando en el siguiente mes al 100% (Figura 5.7). En el muestreo de junio de 2008 se han podido verificar los primeros machos en puesta, representados por el 33,3% de individuos en el estadio IIIB. El estadio IIIC fue observado en los muestreos de agosto (16,7%) y septiembre (20%) de 2008, produciéndose en agosto un cambio de sexo y en septiembre se mantiene el sexo con la renovación de las células gametogénicas. En los meses de septiembre y octubre de 2008, se han verificado respectivamente el 40% y el 100% de ostras en el estadio IIID, representando el fin del periodo reproductivo.

Durante el segundo año, la maduración de los machos se prolonga hasta el muestreo de agosto de 2009, donde se puede verificar el 100% de individuos en el estadio IIIA. Entre los meses de agosto y septiembre de 2009, ocurre una puesta masiva, definida por la presencia del 100% de los individuos con espermatozoides residuales en la gónada (estadio IIID).

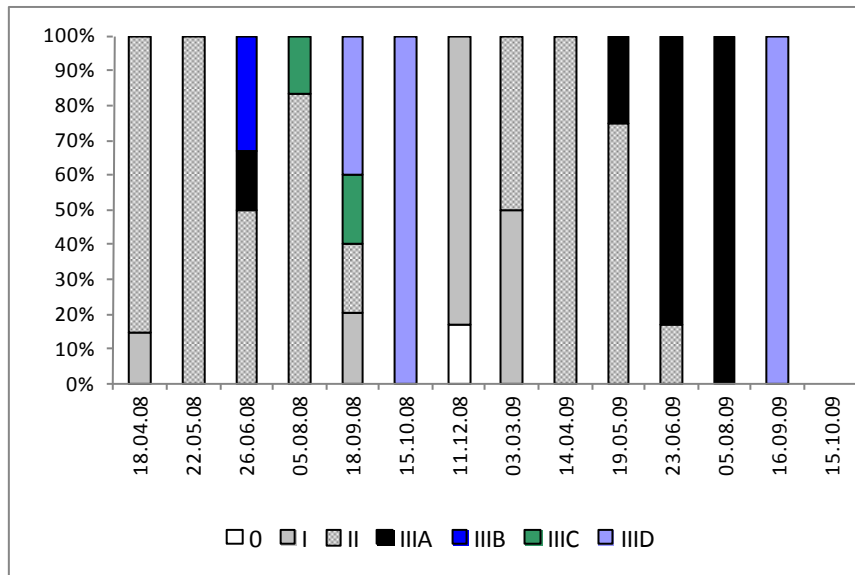


Figura 5.7. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para machos de *C. gigas* cultivados en sistema de jaulas.

Las hembras no desarrollaron completamente sus gónadas, una vez que no se observaron en las preparaciones histológicas individuos en el estadio IIIA (maduración) en los dos años de muestreo. El máximo desarrollo gonadal fue observado en el mes de junio de 2008, cuando el 100% de los individuos evaluados presentaban el estadio II (gametogénesis). Consecuentemente no se han verificado periodos de puesta, confirmado por la ausencia de hembras en el estadio IIIB (Figura 5.8).

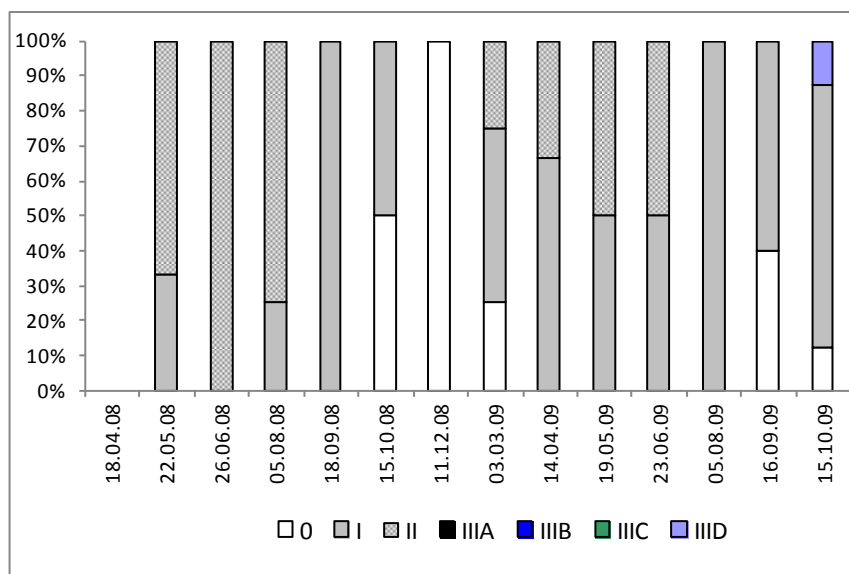


Figura 5.8. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para hembras de *C. gigas* cultivadas en sistema de jaulas.

5.3.4.2. Sistema de Cuerdas

La evolución de los estadios de desarrollo gonadal en machos cultivados en cuerdas está representada en la figura 5.9. La gametogénesis fue intensa en los tres primeros muestreos alcanzando en el mes de junio de 2008 el 33,3% de individuos en el estadio IIIA (maduración). Entre los meses de junio y agosto de 2008 ocurren las primeras emisiones de espermatozoides al medio natural, representados por el 20% de machos en el estadio IIIB y por el 40% en el estadio IIIC. Esta situación de puesta es mantenida e incrementada en el mes de septiembre, cuando se observaron un 50% de ostras en el estadio IIIB.

En los meses de octubre y diciembre ocurren las últimas puestas representadas por el estadio IIID, en porcentajes del 28,6 y 37,5% respectivamente. Paralelamente se empieza un nuevo ciclo reproductivo, confirmado por la presencia de individuos en el estadio I (multiplicación de las espermatogonias).

Durante el segundo año de muestreo los machos siguen la misma tendencia de desarrollo gonadal observada en el primer año, donde hay una fuerte gametogénesis en primavera llegando al mes de mayo de 2009 con un 50% de individuos en el estadio IIIA. La puesta, con relación al año anterior, se adelanta para el mes de junio de 2009 y se da masivamente, representada por un 60% de individuos en el estadio IIIB y un 20% en el estadio IIIC. Entre los meses de agosto y septiembre de 2009 ocurre una recuperación y maduración de las ostras ocurriendo un segundo pico de puesta entre septiembre y octubre con un 100% de ostras en el estadio IIID.

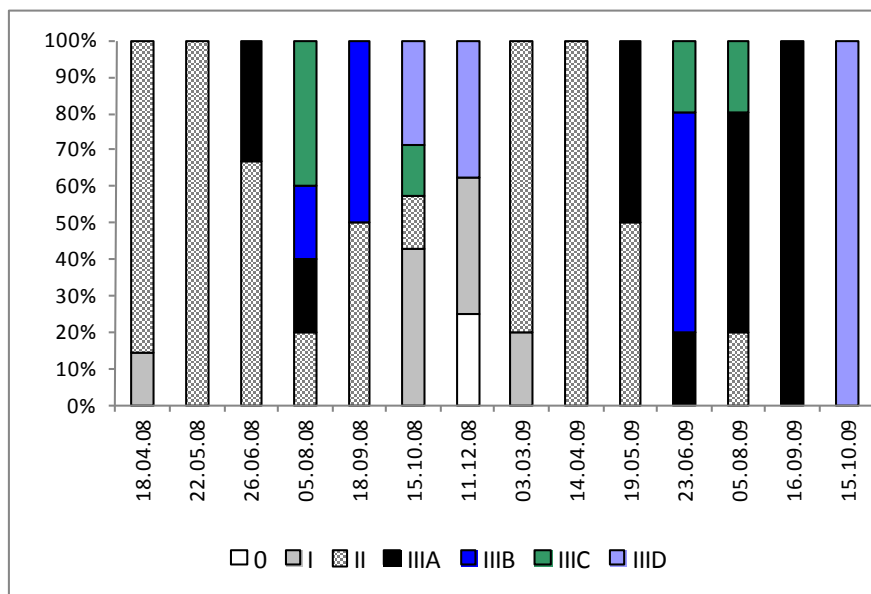


Figura 5.9. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para machos de *C. gigas* cultivados en cuerdas.

La evolución de los estadios de desarrollo gonadal en hembras cultivadas en cuerdas está representada en la figura 5.10. Como en los machos, la gametogénesis fue intensa en los primeros muestreos, llegando a alcanzar un máximo del 42,9% de individuos en el estadio IIIA en el mes de junio. La puesta se da masivamente entre finales de junio y principios de agosto de 2008, representada por un 20% de individuos en el estadio IIIB y un 60% en el estadio IIIC. El fin de la estación de reproducción, representado por el 50% de las ostras en el estadio IIID, es muy marcado en el muestreo de diciembre.

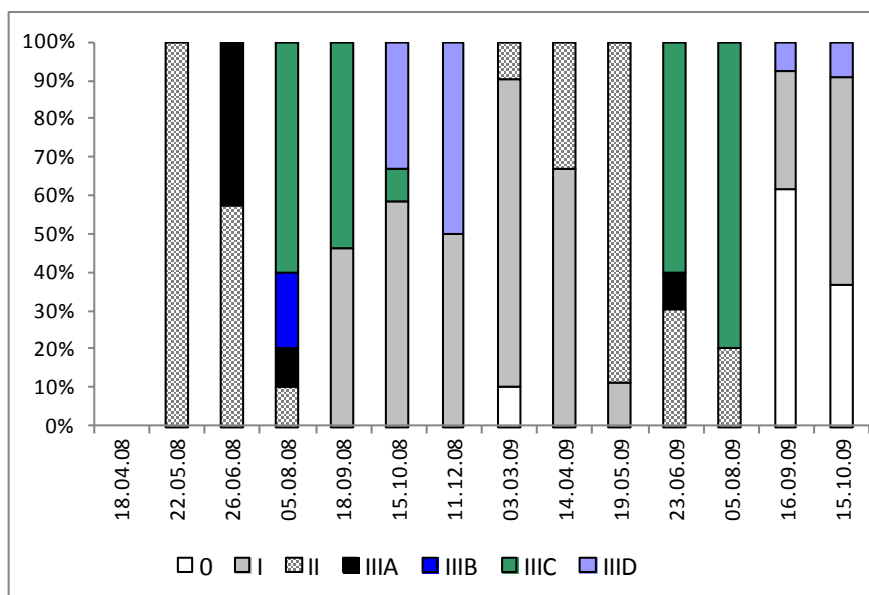


Figura 5.10. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para hembras de *C. gigas* cultivadas en cuerdas.

Durante el segundo año de muestreo la maduración de las ostras sigue el mismo patrón del año anterior, con una rápida maduración en los primeros muestreos. El periodo de puesta se adelanta para el mes de junio, representado por el 60% de hembras en el estadio IIIC y se mantiene el siguiente mes con un 80% de las ostras empezando el desarrollo de un nuevo ciclo gonadal (estadio IIIC).

5.3.5. Variables ambientales

La evolución de la temperatura durante los dos años de estudio (Figura 5.11) presenta un ciclo estacional muy marcado, con un incremento durante la primavera, valores elevados durante el verano, que no llegan a los 20 °C, disminución durante el otoño y valores bajos durante el invierno, con mínimas de 11,81 °C en 2008 y 11 °C en 2009.

La evolución del contenido en clorofila *a* (Fig. 9) fue distinta en los dos años de estudio. Durante el primer año (2008) se han verificado dos picos, uno en primavera (28/04) con 3,42

µg/l y el otro en otoño (22/09) con 3,10 µg/l. En el siguiente año (2009), los valores de clorofila *a* se distribuyen con gran dispersión durante finales de invierno y primavera con valores máximos de 1,93 µg/l en 16/03 y 2,05 en 11/05. Como en el año anterior se observa un pico otoñal de 2,76 µg/l de clorofila *a* en 28/09.

La salinidad por su parte, presenta valores muy contantes con un promedio de 34,72 ± 0,97‰ en 2008 y 34,42 ± 1,54‰ en 2009.

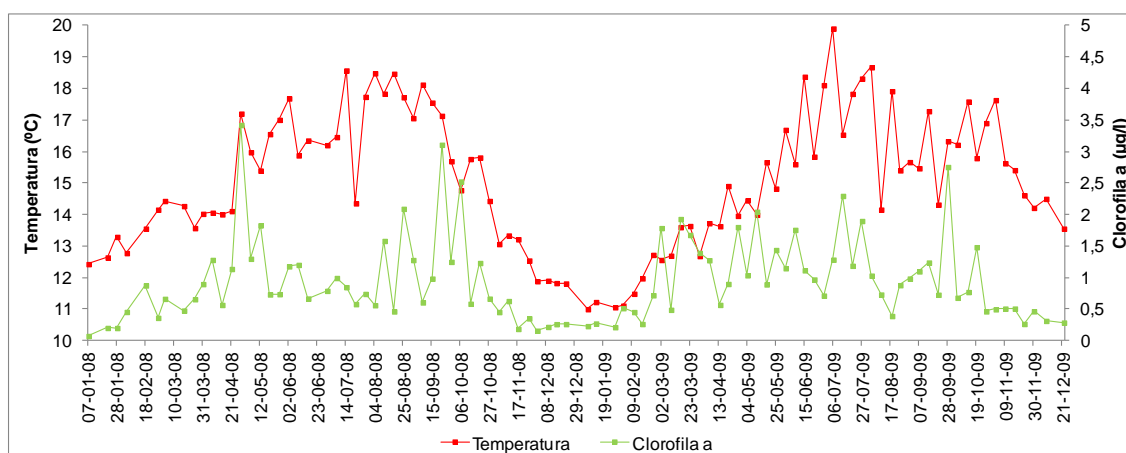


Figura 5.11. Evolución de los valores de temperatura y clorofila *a* en el Polígono A7 de O Grove, Ría de Arousa, durante el periodo de estudio.

5.3.6. Relación entre los factores ambientales y el IOG e IC

Los coeficientes de correlación y valores de r^2 obtenidos a través de la regresión múltiple entre los datos del índice de ocupación gonadal (IOG) y del índice de condición (IC) y las variables ambientales (temperatura, salinidad y clorofila *a*) en machos y hembras cultivados bajo los sistemas de jaulas y cuerdas están representados en la tabla 5.4.

En el sistema de jaulas, los machos en el primer año presentaron una correlación moderada del IOG con la temperatura y baja correlación con la salinidad y con la clorofila *a*. Durante el segundo año la correlación del IOG con las variables ambientales se incrementan, alcanzando valores de 0,77 para la temperatura y -0,88 para la clorofila *a*. En el caso de las hembras, en el primer año los valores de correlación entre la temperatura y la clorofila *a* y el IOG fueron los mismos que para los machos, diferenciándose solamente en la correlación con la salinidad que ha presentado el valor de -0,59. Durante el segundo año las hembras incrementan la correlación de los valores del IOG con la temperatura y con la clorofila *a*, como ha ocurrido con los machos.

A través de la realización del análisis de regresión múltiple se ha podido verificar una moderada explicación de la variación del IOG en machos cultivados en jaulas durante el primer año, valores elevados de r^2 durante el segundo año en machos y valores elevados durante todo el

cultivo en hembras. Estos valores de r^2 presentaron una evolución diferente entre los sexos de las ostras cultivadas en jaulas incrementándose desde el primer para el segundo año en machos y disminuyendo en hembras.

En el sistema de cuerdas, la correlación de las variables ambientales con el IOG fue elevada solamente para la temperatura durante el primer año de cultivo de los machos. Durante el segundo año de los machos y durante todo el cultivo en hembras la correlación entre el IOG y las variables ambientales fue moderada. Los valores de r^2 obtenidos mediante la regresión múltiple entre las variables ambientales y el IOG fueron de elevados hasta moderados en los machos y de moderados hasta bajos en las hembras.

Los valores de los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos a través de la regresión múltiple entre las variables ambientales y el índice de condición, fueron de moderados a bajos para ambos sistemas de cultivo en los dos años de muestreo, con una única excepción en la relación entre la temperatura y el IC en cuerdas durante el segundo año donde ha presentado un valor de 0,72. La variación del IC en función de las variables ambientales (temperatura, salinidad y clorofila *a*) fue moderadamente explicada por el modelo generado a través de la regresión con valores de r^2 variando desde 0,15 hasta 0,67.

Tabla 5.4. Valores de r^2 y coeficientes obtenidos en el análisis de correlación de Pearson entre el IOG e IC, y las variables ambientales (temperatura, salinidad y concentración de clorofila *a*) durante todo el período de estudio.

	Temperatura	Salinidad	Clorofila <i>a</i>	r^2
IOG macho jaula (1° año)	0,39	-0,08	0,08	0,37
IOG macho jaula (2° año)	0,77	0,22	-0,88	0,95
IOG hembra jaula (1° año)	0,39	-0,59	0,08	0,91
IOG hembra jaula (2° año)	-0,57	-0,07	0,75	0,62
IOG macho cuerda (1° año)	0,84	0,39	0,24	0,87
IOG macho cuerda (2° año)	0,42	0,67	0,26	0,68
IOG hembra cuerda (1° año)	0,51	0,16	0,08	0,68
IOG hembra cuerda (2° año)	0,21	-0,23	-0,31	0,25
IC jaula (1° año)	0,33	-0,24	-0,07	0,67
IC jaula (2° año)	0,27	0,01	-0,37	0,15
IC cuerda (1° año)	0,32	0,40	-0,33	0,58
IC cuerda (2° año)	0,72	0,36	-0,20	0,64

5.4. DISCUSIÓN

Sex-ratio

La ostra japonesa *C. gigas* es descrita en la literatura como una especie hermafrodita sucesiva protándrica irregular (Buroker, 1983; Guo *et al.*, 1998), de esta forma normalmente en su primer ciclo de desarrollo gonadal las ostras maduran como machos. Guo *et al.* (1998) proponen un modelo de locus simple para explicar la determinación del sexo en *C. gigas*. Este modelo estaría constituido de un alelo macho dominante (M) y un alelo hembra protándrico (F), resultando dos poblaciones de machos: los machos verdaderos (MF) que no cambian de sexo durante toda la vida y los machos cambiantes (FF) que pueden desarrollar el sexo hembra bajo control de genes secundarios o de factores ambientales.

El estudio de la formación de los sexos en ostras ha sido reportado por diversos autores (Guo *et al.*, 1998; Berthelin *et al.*, 2001; Fabioux, 2004; Naimi, 2009) pero nunca evaluando el efecto de diferentes sistemas de cultivo. Normalmente los datos obtenidos en los trabajos apuntan una formación de machos en el primer ciclo gonadal y en los años con falta de alimento o situaciones con gran competencia por el alimento (Galtsoff, 1964; Guo *et al.*, 1998; Steele y Mulcahy, 1999). El cambio del sexo ocurre normalmente después de la puesta del primer ciclo gonadal, pudiendo la ostra, inicialmente macho, mantener el sexo actual o cambiar para hembra. El incremento de la proporción de hembras está normalmente relacionado con la disponibilidad de alimento en el ambiente natural (Fabioux *et al.*, 2005). Sin embargo, esta teoría no está claramente demostrada (Baghurst y Mitchell, 2002).

En el presente capítulo se ha podido observar que durante el primer ciclo gonadal de las ostras cultivadas en jaulas hubo una predominancia de machos, sin embargo en las ostras cultivadas en cuerdas durante el periodo de puesta hubo una predominancia de hembras. Este resultado, cuando se amplía a todo el periodo de estudio, a través del análisis del sex-ratio, se mantiene en las ostras cultivadas en jaulas, con una superioridad significativa de machos, contrastando con el resultado obtenido en el sistema de cuerdas donde las hembras fueron significativamente más abundantes durante todo el cultivo.

La diferencia de la proporción de sexos observada durante los dos años de estudio nos apunta un efecto del sistema de cultivo sobre la formación del sexo. Este efecto estaría relacionado principalmente con las diferencias entre ambos sistemas en relación con la densidad y la competencia por el alimento observado en el sistema de jaulas, comparado con la poca influencia de estos factores en el sistema de cuerdas. Este comportamiento confirmaría la hipótesis de Fabioux *et al.* (2005) sobre el efecto de la disponibilidad de alimento y el porcentaje de hembras.

La manipulación de la proporción sexual puede ser una herramienta la cual productores comerciales pueden incrementar el crecimiento y el desarrollo gametogénico de los bivalvos (Baghurst y Mitchell, 2002). Así, utilizando el sistema de cuerdas se podría obtener ostras con una mayor proporción de hembras y con valores superiores en índice de condición, lo que representa básicamente una mayor cantidad de carne en relación a la cantidad de concha.

Análisis cuantitativo

Para el seguimiento del desarrollo gonadal de ostras normalmente se utilizan métodos cuantitativos, como la determinación del peso fresco y seco de la carne, índices de condición y la utilización del análisis de imagen; y cualitativos como la histología. Uno de los métodos cuantitativos más utilizados en ostras son los índices de condición que normalmente correlacionan el peso de la carne con el peso de la concha (Bodoy *et al.*, 1986; Crosby y Gale, 1990; Mason y Nell, 1995; Steele y Mulcahy, 1999; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Royer *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Chávez-Villalba *et al.*, 2010). En el presente capítulo, el índice de condición utilizado fue el descrito por Walne y Mann (1975) que correlaciona el peso seco de las partes blandas con el peso seco de las valvas.

Los datos obtenidos apuntan una superioridad significativa del IC en las ostras cultivadas en cuerdas durante todo el periodo de estudio, con incrementos durante la primavera y bajada en verano (entre junio y agosto) en ambos sistemas de cultivo utilizados. La evolución del IC, independiente del sistema de cultivo utilizado, es similar a la observada por diversos autores que trabajaron con la ostra japonesa (Ruiz *et al.*, 1992a; Mason y Nell, 1995; Steele y Mulcahy, 1999; Baghurst y Mitchell, 2002; Fabioux *et al.*, 2005; Normand *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

Otra manera cuantitativa de evaluar el desarrollo gonadal es la utilización del análisis de imagen, a través de la determinación del área gonadal, del área de la gónada ocupada por los gametos y de la determinación del número de gametos en la gónada (Meneguetti *et al.*, 2004; Enríquez-Díaz *et al.*, 2009; Domínguez, 2010). La técnica utilizada en el presente capítulo fue descrita por Delgado y Pérez Camacho (2003), que determina el área ocupada por los gametos en la gónada. A través de esta técnica se ha podido observar una superioridad significativa del IOG en las ostras cultivadas en cuerdas. Este resultado nos informa que las gónadas de las ostras cultivadas en cuerdas, independiente del sexo, presentan más gametos, pudiendo generar más descendientes.

La superioridad de los valores del IC y del IOG durante todo el periodo de estudio en las ostras cultivadas en cuerdas plantean que las ostras cultivadas en jaulas presentan lo que diversos autores denominan como competencia intraespecífica (Boromthanarat y Deslous-Paoli, 1988; Fréchette *et al.*, 1992; Fréchette *et al.*, 1996; Gascoigne *et al.*, 2005). Esta competencia

está relacionada principalmente al incremento de la densidad poblacional y la consecuente limitación de los recursos (espacio/alimento) disponibles a los organismos cultivados. Estas limitaciones normalmente conllevan a reducciones en el crecimiento (Peterson y Beal, 1989; Parsons y Dadswell, 1992; Alunno-Bruscia *et al.*, 2000; Cubillo *et al.*, 2012b) y cambios en la morfología (Fréchette y Lefaivre, 1990; Alunno-Bruscia *et al.*, 2001; Lauzon-Guay *et al.*, 2005; Cubillo *et al.*, 2012a), existiendo escasa información sobre el efecto de la competencia intraespecífica sobre el desarrollo gonadal. A través de los datos del IC y del IOG obtenidos en el presente capítulo se puede afirmar que el sistema de cultivo afecta directamente a la obtención del alimento y su consecuente transformación en reservas y desarrollo de los gametos.

Cuando comparamos la evolución del IOG entre los sexos en los dos sistemas de cultivo, hay una superioridad significativa de los machos en ambos sistemas de cultivo. Esta superioridad de la proporción de células gametogénicas masculinas sobre la proporción de células femeninas, durante el desarrollo gametogénico indica una mayor capacidad de los machos en producir gametos (Delgado y Pérez Camacho, 2003) lo que podría estar directamente correlacionada a una menor cantidad de energía necesaria para el desarrollo de espermatozoides cuando comparada a la formación de ovocitos (Choi *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo gametogénico, los datos del IOG presentan una elevación constante hasta mayo-junio en ambos sistemas de cultivo, lo que indica que la máxima cantidad de gametos presentes en la gónada es alcanzada en finales de primavera, confirmando lo observado por Enríquez-Díaz *et al.* (2009). En las ostras cultivadas en cuerdas ocurre una bajada significativa de los valores del IOG, lo que apunta una posible puesta diferentemente de lo que ocurre con las ostras cultivadas en jaulas.

Análisis cualitativo

Cuando evaluamos el desarrollo gonadal desde el punto de vista cualitativo, uno de los métodos más utilizados y aceptados es el análisis histológico (Yakovlev, 1977; Massapina *et al.*, 1999; Stele y Mulcahy, 1999; Berthelin *et al.*, 2001; Fabioux *et al.*, 2005; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Cadavid, 2008; Royer *et al.*, 2008; Huvet *et al.*, 2010). A través de este análisis es posible verificar el desarrollo de las células gametogénicas, determinándose microscópicamente el estadio del desarrollo gonadal más representativo en la preparación histológica.

La evolución de los estadios de desarrollo gonadal en las ostras cultivadas bajo los dos sistemas utilizados en el presente capítulo presenta gran diferencia. Las ostras cultivadas en cuerdas presentan el desarrollo total de machos y hembras, madurando los gametos hasta mayo-junio y presentando puesta durante el verano.

Las ostras cultivadas en jaulas presentan un desarrollo diferente entre los sexos, donde los machos presentan maduración total de los gametos hasta mayo del primer año y agosto del segundo año con liberación de los espermatozoides al medio natural en junio del primer año y septiembre del segundo año. Sin embargo, las hembras cultivadas en jaulas no llegan a madurar totalmente sus gametos alcanzando, en ambos años de estudio, como máximo desarrollo gonadal el estadio II, consecuentemente no liberando ovocitos al medio natural.

De esta manera, el cultivo en jaulas en densidades elevadas limita la proliferación de esta especie en el área de cultivo durante los primeros años de vida. Sin embargo, cuando comparamos a los resultados obtenidos en el capítulo 3, donde se siguió el desarrollo gonadal de ostras cultivadas en jaulas a bajas densidades durante el segundo y tercer año de vida, se ha podido observar un desarrollo gametogénico total tanto de machos como de hembras. Estos resultados indican que el incremento de la densidad de cultivo es un factor que afecta directamente al desarrollo gametogénico, influyendo principalmente en las hembras.

Esta situación que ocurre con las hembras parece estar relacionada principalmente a la disponibilidad de alimento y los mayores requerimientos energéticos de las hembras con respecto a los machos, una vez que dentro de las jaulas ocurre una disminución del alimento disponible proporcionalmente al incremento de la densidad de individuos. Las otras variables (temperatura y salinidad) parecen tener un papel secundario, una vez que las ostras cultivadas en cuerdas en la misma batea presentan un desarrollo total tanto de machos como de hembras.

Los ovocitos producidos por las hembras cultivadas en jaulas no llegaron a desarrollarse por completo y probablemente fueron reincorporados por el individuo en forma de energía. Este proceso de reabsorción de los ovocitos es denominado por algunos autores como atresia (Lucas, 1982; Lubet *et al.*, 1987; Pipe, 1987). Sin embargo, normalmente este término se aplica a los ovocitos que alcanzaron la maduración máxima y no fueron liberados al medio (Steele y Mulcahy, 1999; Lango-Reynoso *et al.*, 2000), a diferencia de lo descrito en el presente capítulo, donde en ninguna de las hembras cultivadas en jaulas, se alcanzó la maduración total de los ovocitos.

La atresia está normalmente relacionada a cambios de temperatura en el ambiente, lo que conlleva a una regresión de los ovocitos maduros y la consecuente paralización de la puesta, en el caso de haber empezado o la no existencia de la misma. Chávez-Villalba *et al.* (2007) indican que *C. gigas* cultivada en México alcanza la maduración, sin embargo no llega a realizar la liberación de los gametos, siendo esta conclusión reforzada por la no existencia de poblaciones salvajes, lo que coincide con lo obtenido por Mann (1979) estudiando ostras introducidas en aguas británicas, donde el agua raramente supera los 18 °C, y que estos individuos alcanzan la maduración pero casi nunca desovan. Resultados similares fueron obtenidos por Bernard (1974) en la Columbia británica en Canadá.

A la temperatura, normalmente, le han asignado el papel principal como inductor del desarrollo gametogénico en *Crassostrea gigas* (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Chávez-Villalba *et al.*, 2001). En nuestro estudio, entre las variables ambientales evaluadas durante el cultivo, la temperatura es la que presenta los valores más elevados del coeficiente de correlación de Pearson, resultado este que denota la mayor influencia de esta variable sobre el desarrollo gametogénico en las ostras cultivadas, independiente del sistema de cultivo utilizado.

Algunos autores indican un umbral térmico para el comienzo del desarrollo gametogénico en ostras, entre ellos podemos destacar los trabajos de Mann (1979) que apunta un valor mínimo de 10,5 °C y Fabioux *et al.* (2005) que alcanzaron la maduración de las ostras en temperaturas de 8-10 °C, consecuentemente con valores del umbral térmico más bajos. La temperatura mínima observada en el área de cultivo durante los dos años fue de 11 °C, de esta manera las ostras cultivadas siempre estarían en proceso de gametogenesis, sin embargo en los dos sistemas de cultivo se observaron ostras en reposo sexual (estadio 0), con un porcentaje del 100% en las hembras cultivadas en jaulas. A través de estos resultados se podría plantear que las hembras cultivadas en jaulas no almacenaron las reservas necesarias para el comienzo de la gametogénesis, y consecuentemente no llegaron a formar gametos maduros, diferentemente al que ha ocurrido con las ostras cultivadas en cuerdas las cuales llegaron a madurar sus gametos y realizar la puesta.

5.5. CONCLUSIONES

- El sistema de cultivo afecta directamente a la formación del sexo, produciéndose más machos en el sistema de jaulas y más hembras en cuerdas, confirmando la hipótesis del efecto de la disponibilidad de alimento en la definición del sexo en *C. gigas*.
- El sistema de cultivo en jaulas afecta directamente a la obtención del alimento y su consecuente transformación en reservas y desarrollo de los gametos.
- El sistema de jaulas, a diferencia del cultivo en cuerdas, plantea un ambiente con una fuerte competencia por el espacio y el alimento, que lleva aparejado un retraso en la gametogénesis y una mayor presencia de individuos indeterminados.
- El cultivo en cuerdas, desde el punto de vista del desarrollo gonadal, es más eficiente, produciéndose ostras con valores superiores del índice de condición y del índice de ocupación gonadal, lo que conlleva respectivamente a individuos con más carne y más gametos.
- La evolución del índice de ocupación gonadal es un buen indicador del periodo reproductivo, alcanzando su máximo en primavera, antes del inicio de la puesta.
- El cultivo en jaulas en densidades elevadas limita la proliferación de la ostra japonesa en el área de cultivo durante los primeros años de vida.
- Las hembras cultivadas en jaulas son las más afectadas por este sistema de cultivo, no llegando a madurar sus ovocitos y ocurriendo una posible reabsorción de los gametos.
- La temperatura es la variable que presenta mayor influencia sobre el desarrollo gametogénico en las ostras cultivadas, independiente del sistema de cultivo utilizado.
- La temperatura mínima registrada en el área del cultivo (11 °C) no es limitante para el desarrollo gonadal y las temperaturas máximas superan el umbral para la puesta, ocurriendo la misma en temperaturas inferiores a los 20 °C.
- El estado nutricional y la baja temperatura condicionan un periodo de reposo en las hembras cultivadas en jaulas entre finales del primer año y principios del segundo año.

**6. EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA
COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA GENERAL DE *Crassostrea gigas*
EN RELACIÓN AL CICLO REPRODUCTIVO**

EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA GENERAL DE *Crassostrea gigas* EN RELACIÓN AL CICLO REPRODUCTIVO

6.1. INTRODUCCIÓN

La ostra japonesa *Crassostrea gigas* es cultivada en el mundo bajo diferentes sistemas de cultivo, mientras que en Galicia el cultivo de las ostras se realiza principalmente en bateas. Las experiencias de producción de la ostra plana *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) en bateas de las Rías gallegas apuntan dos sistemas de cultivo principales, uno con la utilización de cestas ostrícolas plásticas y el otro con cuerdas, donde las ostras son pegadas con cemento (Pérez Camacho y Román, 1985). Este sistema de cultivo, viene siendo utilizado en Galicia desde 1967, cuando Andreu desarrolla esta técnica de engorde (Pardellas y Polanco, 1987).

La introducción de la ostra japonesa *C. gigas* en Galicia fue liberada en 1991 (Xunta de Galicia, 1992) y en sus primeros intentos de cultivo se verificó una mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *O. edulis* de cultivo tradicional y autóctona de esta zona (Fernández *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta el momento no se tiene un protocolo de cultivo que indique el mejor sistema para el engorde de la ostra japonesa en las Rías gallegas.

La influencia de la técnica utilizada para mantener las ostras en cultivo se basa principalmente en la diferencia que ambos sistemas proporcionan en el desarrollo de las ostras. Normalmente, los trabajos de cultivo de ostras que comparan diferentes sistemas, evalúan el efecto sobre el crecimiento y supervivencia (Southgate y Beer, 2000; Iglesias *et al.*, 2005; Carlucci *et al.*, 2010; Milione y Southgate, 2011; Mallet *et al.*, 2013). Hasta la fecha, no encontramos registros en la literatura que evalúen el efecto del sistema de cultivo en la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas en *Crassostrea gigas*.

El ciclo estacional de almacenamiento y utilización de reservas en bivalvos mantiene una estrecha relación con el ciclo reproductivo y la disponibilidad de alimento en el medio, donde parte de la energía asimilada por los bivalvos se emplea en la formación de reservas en épocas de abundancia nutricional, para ser utilizada en situaciones de poca disponibilidad alimenticia o de importantes demandas energéticas. Durante estos periodos de acumulación, la energía disponible, una vez supere los requerimientos energéticos del individuo, mantenimiento y síntesis de estructuras, se empleará en la formación de reservorios energéticos.

Las variaciones estacionales en la actividad metabólica de los bivalvos marinos reflejan las complejas interacciones entre la disponibilidad de alimento, las condiciones ambientales y la actividad reproductiva (Bayne y Newell, 1983; MacDonald *et al.*, 2006).

En el presente capítulo se ha hecho un análisis del efecto del sistema de cultivo sobre la dinámica de acumulación y movilización de las reservas bioquímicas en relación al ciclo reproductivo de *C. gigas* en la Ría de Arousa.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Área de estudio y muestreo

El estudio del efecto del sistema de cultivo sobre la evolución de la composición bioquímica general se llevó a cabo con ostras de aproximadamente 7 meses de vida que fueron traídas de la Bahía de Arcachon (Francia) en el mes de marzo de 2008 y fueron cultivadas en una batea situada en el Polígono A7 de O Grove en la Ría de Arousa (42° 30' 30" N, 8° 51' 54" W), entre abril de 2008 y octubre de 2009 bajo los sistemas de cultivo de jaulas y cuerdas.

Las jaulas, patentadas por el IEO, son estructuras cilíndricas compuestas por bandejas plásticas circulares envueltas por una malla externa intercambiable. Se utilizaron en cada jaula 6 bandejas (con un diámetro de 0,36 m, altura de 0,15 m y una superficie de 0,1 m²) recubiertas por una malla de 10 mm. La densidad utilizada en el sistema de jaula fue de 100 ostras/bandeja, lo que supone un número de 1000 ostras por metro cuadrado. La cuerda es un sistema tradicional utilizado para el cultivo de la ostra plana *Ostrea edulis*. En el presente estudio se hicieron cuerdas de 6 metros de largo con ostras pegadas con cemento en grupos de 4, con una distancia media de 15-20 cm entre grupos, totalizando 150 ostras por cuerda.

En el sistema de jaulas se cambiaron las mallas externas por mallas nuevas de iguales características en el mes de junio de 2008, pasado dos meses de cultivo. Las cuerdas permanecieron sin cambios hasta el final del cultivo.

Para este estudio, se recogieron muestras de 20 ostras en cada sistema de cultivo (jaulas y cuerdas) con intervalos de aproximadamente un mes, durante el período de abril de 2008 hasta octubre de 2009. Una vez recogidas, las ostras fueron conducidas hasta el Centro Oceanográfico da Coruña del Instituto Español de Oceanografía (IEO), donde se realizaron los muestreos. En estos muestreos, cada ostra fue medida (longitud y anchura) con un calibre con una precisión de 0,1 mm y pesada (peso total y peso fresco de las partes blandas) utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Tras ser medidos y pesados, se realizó la determinación sexual mediante un frotis. A continuación se liofilizaron las partes blandas de 10 ostras, durante tiempo suficiente para garantizar un peso constante, en un liofilizador, anotándose el peso seco de los organismos. Las muestras fueron mantenidas a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

6.2.2. Composición bioquímica general

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica (%MO), cada muestra fue pulverizada en un mortero de porcelana y el contenido inorgánico se obtuvo por calcinación a 450 °C de partes alícuotas (aproximadamente 20 miligramos).

Para la determinación de los componentes bioquímicos generales (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos) se tomaron 20 mg del tejido liofilizado de cada ostra y se homogenizaron en 1000 μL de agua destilada, preparándose estos extractos crudos iniciales para los análisis bioquímicos.

6.2.2.1. Proteínas

Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951). En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 50 μL del extracto crudo, el cual se diluyó en 150 μL de ácido tricloroacético al 20% a 4 °C (TCA) (Panreac ref. 131067.1609) y se dejó reposar por 10 minutos a 4 °C. A continuación se centrifugaron las muestras (10000xg, 4 °C, 10 minutos) concentrándola en 10 μL . El sobrenadante obtenido de la centrifugación (190 μL) fue la base para los análisis de carbohidratos y glucógeno. Al sedimento de 10 μL se le añaden 300 μL de NaOH 1M (Panreac ref. 131687), y se incuba a 56 °C por 30 minutos, agitándose en vortex cada 5 minutos. A continuación se llenan las microplacas con 30 μL de la muestra y del estándar y se les agregan 20 μL de la solución BIORAD Protein Assay Reagent A (Ref. 500-0113) y 300 μL de la solución BIORAD Protein Assay Reagent B (Ref. 500-0114). La absorbancia se determinó a 630 nm con un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de albúmina sérica bovina (BSA Fracción V – Sigma A7906-50G), con concentraciones en el intervalo de 0 a 900 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6.2.2.2. Carbohidratos totales

Los carbohidratos se cuantificaron como glucosa por el método del fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). De este modo, se valoraron tanto los monosacáridos de la muestra como los obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de los polisacáridos. En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 50 μL del sobrenadante de las proteínas y se les añadieron 200 μL de solución de Fenol al 5,4% (Panreac ref. 141323) y 1000 μL de ácido sulfúrico puro $d=1,84$ (Fluka 95-97% ref. 84719), dejando en seguida la muestra enfriar por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 490 nm con un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de glucosa, con concentraciones en el intervalo de 0 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6.2.2.3. Glucógeno

El glucógeno se cuantificó por el método del fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956) modificado. En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se agregaron 50 μL

del sobrenadante de las proteínas y se les añadieron 100 μL de etanol al 100% a 4 °C (manteniendo una proporción de 2:1 etanol:muestra), agitándose en un vortex. A continuación se dejó reposar la muestra en hielo por 15 minutos seguido de una centrifugación (1883xg, 4 °C, 20 minutos). Los 100 μL del sobrenadante son descartados y se mantiene solo los 50 μL donde está precipitado el glucógeno. Sobre el precipitado se le adiciona 200 μL de solución de Fenol al 5,4% (Panreac ref. 141323) y 1000 μL de ácido sulfúrico puro $d=1,84$ (Fluka 95-97% ref. 84719), dejando en seguida la muestra enfriar por 30 a 60 minutos en temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 490 ηm con un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de glucosa, con concentraciones en el intervalo de 0 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6.2.2.4. Lípidos totales

Los lípidos totales se cuantificaron de acuerdo al método de sulfo-fosfovainillina para lípidos totales según Zöllner y Kirsh (1962), utilizando el colesterol como estándar. Los lípidos séricos incluyendo el colesterol, forman con el ácido sulfúrico un ion de carbono que reacciona con la fosfovainillina produciendo un complejo de color violeta cuya intensidad se mide colorimétricamente.

En microtubos Eppendorf® previamente rotulados se depositaron 100 μl del extracto crudo inicial, luego a cada tubo se le agregaron 1000 μl de cloroformo:metanol (2:1) a 4 °C agitándose en vortex. Las muestras se dejaron reposar por 15 minutos en temperatura ambiente. Luego los microtubos fueron centrifugados (8000xg, 4 °C, 20 min). Posteriormente, se traspararon 200 μl de la fase inferior, conteniendo los lípidos, a un nuevo set de microtubos rotulados, dejando que se evapore el solvente con las tapas abiertas a 56 °C por 120 minutos. El estándar (3 mg de colesterol. ml^{-1} de cloroformo:metanol (2:1)) se diluyó para preparar la solución de trabajo: 150 mg de colesterol se diluyeron en 50 ml de cloroformo:metanol a 4 °C, luego se procedió a realizar la curva de calibración por duplicado. El preparado de la curva de calibración se dejó evaporar al igual que las muestras. Una vez evaporadas las muestras y la curva de calibración, se procedió a resuspender los lípidos en 200 μl de ácido sulfúrico puro $d=1.84$ (Fluka 95-97% ref. 84719) agitándose en vortex. Inmediatamente después, las muestras con el ácido se calentaron a 90 °C durante 10 minutos con las tapas cerradas. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agitó en un vortex, llevando 20 μl en duplicado a las microplacas. Por último se agregaron 300 μl de la solución de vainillina (100 ml de agua destilada + 400 ml de ácido ortofosfórico + 1 g vainillina (Panreac ref. 142048)) a la microplaca 1 y 300 μl de ácido ortofosfórico a la microplaca 2 y se mantuvieron en oscuridad por 40 minutos en temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 540 ηm en un espectrofotómetro de microplacas. Se utilizó como estándar una solución de colesterol, con

concentraciones en el intervalo de 0 a 175 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La concentración de lípidos en las muestras es calculada disminuyendo el valor obtenido de la placa 1 por el valor obtenido de la placa 2.

6.2.3. Variables ambientales

Los datos de temperatura y salinidad en la columna de agua a una profundidad de 0-5 metros, fueron obtenidos, por una sonda CTD Sea-Bird 25. Los datos de clorofila *a* fueron obtenidos por el filtrado a presión constante de un volumen de 100 mL de agua a una profundidad de 0-5 metros, separando las partículas en dos clases $>2,7 \mu\text{m}$ y $<2,7 \mu\text{m}$, las cuales fueron sumadas para representar el dato de clorofila *a*. La extracción de la clorofila *a* presente en los filtros de fibra de vidrio realizase con acetona al 90% refrigerada y en oscuridad por no menos que 14 horas. Posteriormente se analizan por espectrofotometría por medio de una ecuación tricromática, siguiendo el método de Neveux y Panouse (1987). Todos los datos fueron obtenidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia, en una estación meteorológica ubicada cercana a la batea de cultivo en el polígono A7 de O Grove. Estos datos fueron proporcionados por el INTECMAR en el marco de un convenio entre éste y el IEO para la toma de datos oceanográficos en las Rías Gallegas.

6.2.4 Presentación de los datos y análisis estadístico

Los datos mostrados en las tablas se corresponden con la media total y la desviación estándar (de) de los individuos analizados en cada muestreo. Los valores de los diferentes componentes están expresados en contenido absoluto libre de cenizas ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y en porcentaje de materia orgánica (%MO). Todos los componentes están estandarizados a la talla media de todo el periodo de muestreo dependiendo del sistema de cultivo utilizado (83,2 mm de longitud para jaulas y 90,8 mm para cuerdas). Esta forma de proceder ha sido recomendada por Beninger y Lucas (1984) por dos motivos fundamentales: primero, evita el solapamiento o interferencia entre las variaciones estacionales y las que se deben al crecimiento, y segundo, contrarresta la posibilidad de que las fuertes oscilaciones de un determinado compuesto enmascaren la variación de otros.

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Plus 5.1. Para todos los datos se analizó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, cuando presentaban el mismo número de datos, y de Bartlett cuando presentaban un número distinto. Cuando los datos son normales y las varianzas homogéneas se realizó el Análisis de Varianza Simple (ANOVA) y en los casos en que los datos no se adecuaban a la distribución normal o las varianzas no fueran

homogéneas se empleó la transformación logarítmica para garantizar su homogeneidad, caso se mantiene la no normalidad o homogeneidad de los datos, se aplicó el Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis. Para los tests a posteriori se utilizaron el test de Student-Newman-Keuls (SNK) para los datos analizados por ANOVA y el test Mann-Whitney, comparando datos pareados, cuando los datos seguían una distribución no paramétrica. En todos los casos se utilizó un α de 5%.

Los datos relativos al porcentaje de materia orgánica fueron transformados mediante la transformación angular (arcoseno $\sqrt{\%}$).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Resumen del ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de *C. gigas* cultivada en batea en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas está detallado en el capítulo 5, sin embargo, con la intención de facilitar el entendimiento del efecto del sistema de cultivo sobre la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas y su relación con el ciclo reproductivo, haremos un resumen de los principales resultados obtenidos.

El índice de condición de las ostras cultivadas en cuerdas fue significativamente superior ($P < 0,05$, ANOVA) al obtenido en jaulas, en todos los muestreos (Figura 6.1). Durante el primero año de cultivo, en ambos sistemas, los valores del índice de condición aumentan hasta el mes de junio, seguido de una bajada significativa entre junio y agosto. En el segundo año, en ambos sistemas de cultivo, las ostras no incrementan sus valores de IC como ha ocurrido en el primer año.

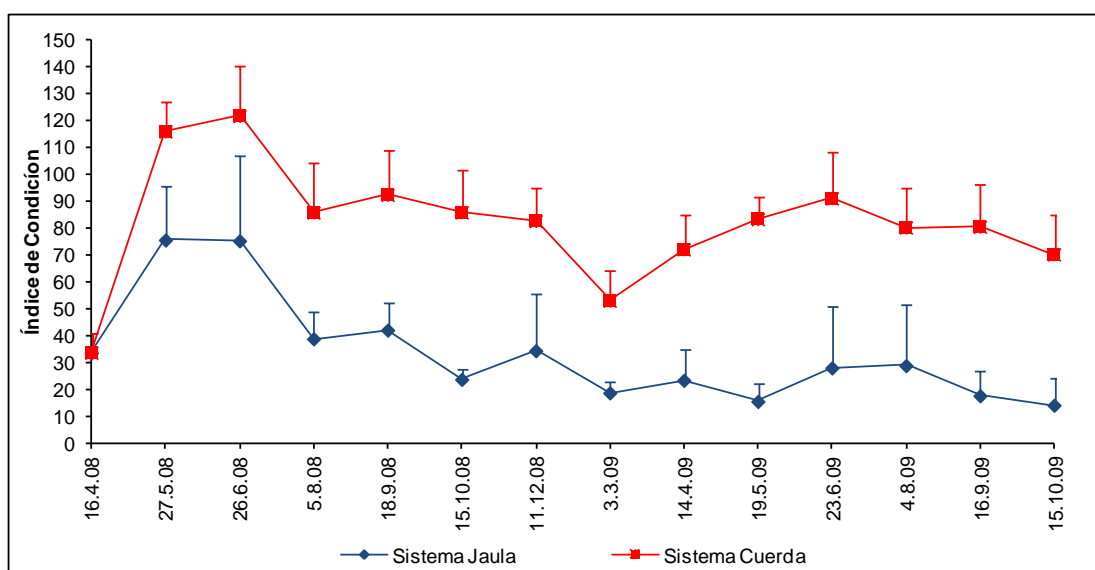


Figura 6.1. Evolución del Índice de Condición de *C. gigas* cultivada en jaulas (dato medio + de) y cuerdas (dato medio + de) en la Ría de Arousa.

Cuando comparamos la evolución del Índice de Ocupación Gonadal (IOG) en los diferentes sistemas de cultivo, podemos observar que el sistema de jaulas presenta valores inferiores al sistema de cuerdas durante todo el cultivo con excepción del muestreo de diciembre (Figura 6.2). Sin embargo, los valores del IOG son significativamente inferiores solamente en los muestreos de junio y agosto de 2008 y agosto de 2009 ($P < 0,05$, test *t* de Student). Los

valores del IOG en ambos sistemas de cultivo aumentan conforme avanza el período reproductivo, alcanzando su máximo en finales de primavera en los dos años de estudio.

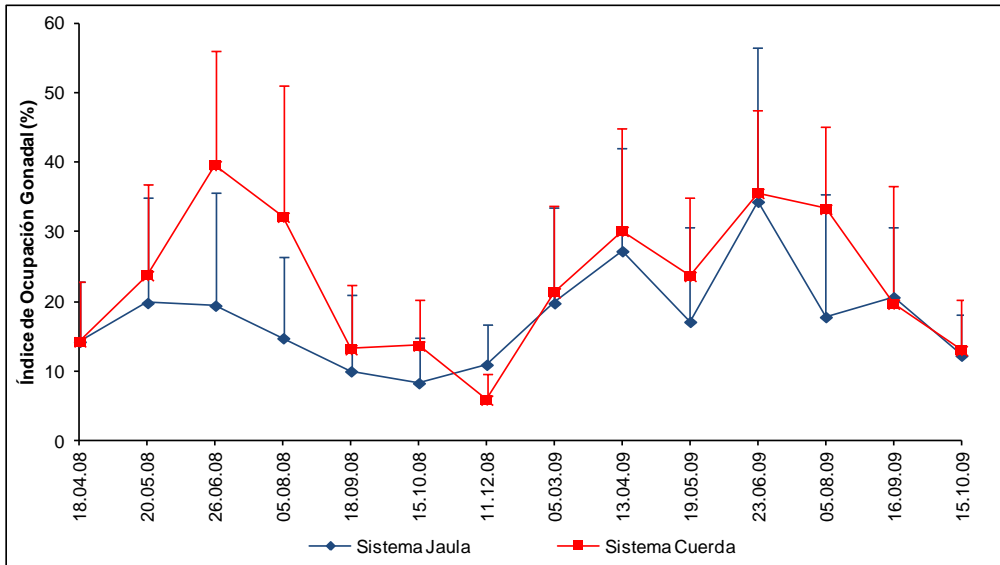


Figura 6.2. Evolución del Índice de Ocupación Gonadal de *C. gigas* cultivada en jaulas (dato medio + de) y en cuerdas (dato medio + de) en la Ría de Arousa.

Las ostras cultivadas en el sistema de jaulas presentan una evolución distinta en relación al sexo. Las hembras no desarrollaron completamente sus gónadas, una vez que no se observaron en las preparaciones histológicas individuos en el estadio IIIA (maduración) en los dos años de muestreo y consecuentemente no se han verificado periodos de puesta (Figura 6.3).

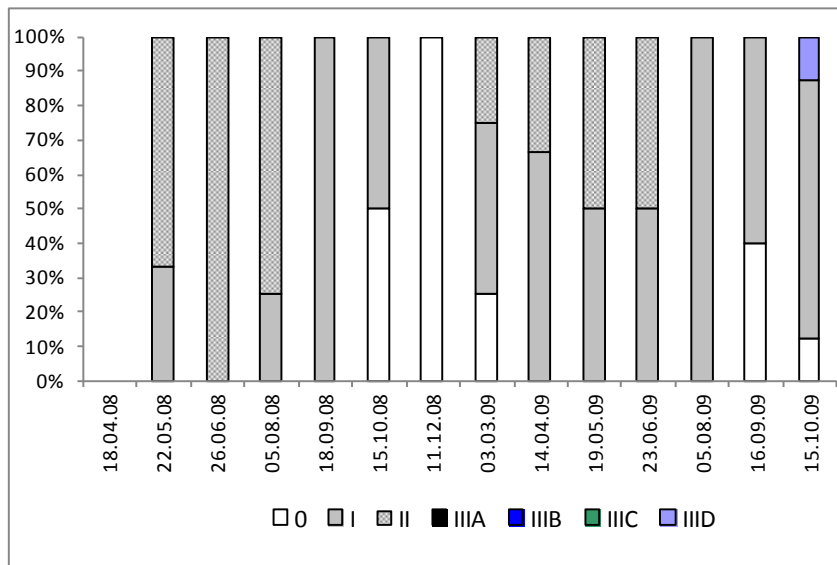


Figura 6.3. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para hembras de *C. gigas* cultivadas en el sistema de jaulas.

Los machos presentan en el primer año una puesta en el mes de junio, representada por el 33% de individuos en el estadio IIIB, seguido de una recuperación en los dos meses siguientes hasta llegar al estadio de fin de la estación reproductiva (IIID) en los meses de septiembre y octubre, dónde sólo existen espermatozoides residuales (Figura 6.4). En el segundo año, la maduración en los machos se prolonga hasta el muestreo de agosto (100% en el estadio IIIA) seguido de una puesta masiva entre agosto y septiembre (100% en el estadio IIID).

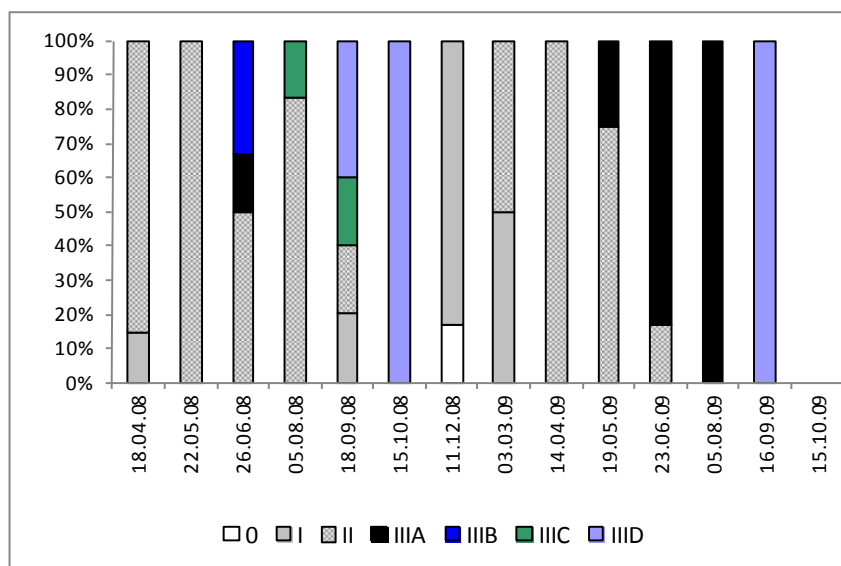


Figura 6.4. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para machos de *C. gigas* cultivados en el sistema de jaulas.

Las ostras cultivadas en el sistema de cuerdas presentaron una gametogénesis intensa durante la primavera llegando a observar los primeros individuos maduros en junio del primer año para ambos sexos y en mayo del segundo año para machos y junio para hembras (Fig. 6.5 y 6.6). Las puestas ocurrieron en el primer año a partir del mes de agosto para ambos sexos y a partir de junio en el segundo año.

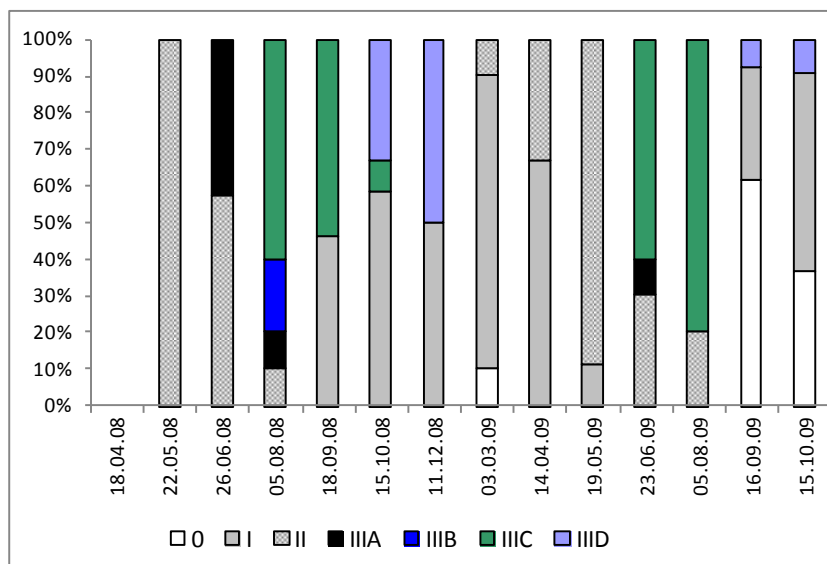


Figura 6.5. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para hembras de *C. gigas* cultivadas en cuerdas.

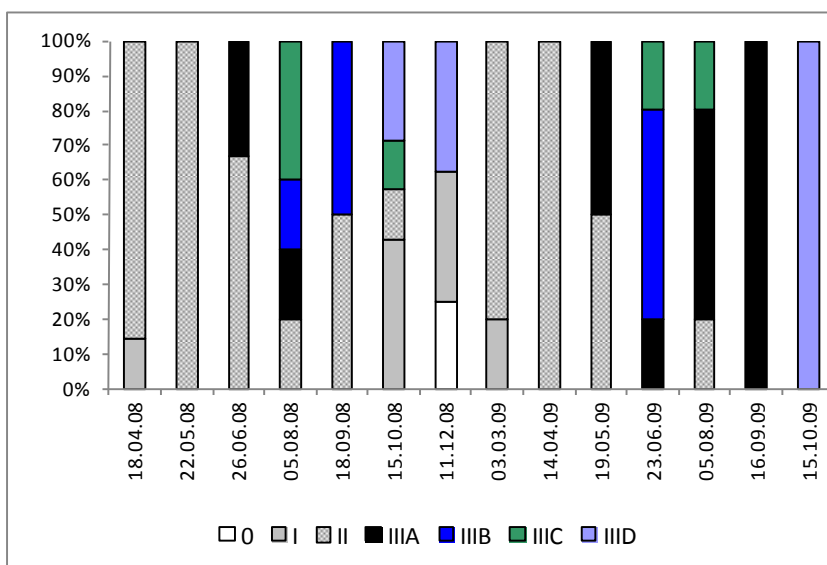


Figura 6.6. Evolución de los estadios de desarrollo gonadal para machos de *C. gigas* cultivados en cuerdas.

6.3.2. Medidas biométricas

6.3.2.1. Jaulas

El peso total, peso fresco de la carne, peso seco estandarizado, longitud y anchura de las ostras cultivadas bajo el sistema de jaulas fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA y Kruskal-Wallis) en relación a la fecha de muestreo (Tabla 6.1).

Los datos de peso total fueron significativamente ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) más elevados en el muestreo de septiembre de 2009 ($102,1 \pm 27,6 \text{ g.ind}^{-1}$), mientras que los valores más bajos fueron observados en abril de 2008 ($4,4 \pm 1,1 \text{ g.ind}^{-1}$). Los valores de longitud siguen el mismo patrón del peso total, con valores significativamente superiores en septiembre de 2009 y más bajos en abril de 2008 ($P < 0,05$, ANOVA, SNK).

Lo valores de peso fresco de la carne, peso seco estandarizado y de anchura presentan valores significativamente superiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el muestreo de junio de 2009 ($11,0 \pm 11,5 \text{ g.ind}^{-1}$, $1,48 \pm 1,51 \text{ g.ind}^{-1}$ y $61,4 \pm 17,7 \text{ cm}$, respectivamente) y valores significativamente más bajos en el muestreo de abril de 2008 ($0,3 \pm 0,1 \text{ g.ind}^{-1}$, $0,15 \pm 0,03 \text{ g.ind}^{-1}$ y $21,8 \pm 3,0 \text{ cm}$ respectivamente).

Tabla 6.1. Medidas biométricas en *Crassostrea gigas* cultivada en jaulas en la Ría de Arousa, entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los datos de peso total, peso fresco de la carne y peso seco estandarizado aparecen expresados en g.ind^{-1} (\pm de) y los datos de longitud y anchura aparecen expresados en cm (\pm de).

Meses	Peso total (g.ind^{-1})	Peso fresco carne (g.ind^{-1})	Peso seco estandarizado (g.ind^{-1})	Longitud (cm)	Anchura (cm)
2008					
Abril	$4,4 \pm 1,1^h$	$0,3 \pm 0,1^e$	$0,15 \pm 0,03^e$	$35,2 \pm 6,1^e$	$21,8 \pm 3,0^f$
Mayo	$12,1 \pm 2,0^g$	$1,7 \pm 0,5^{cd}$	$0,56 \pm 0,19^{abcd}$	$51,6 \pm 4,7^d$	$34,6 \pm 1,5^e$
Junio	$26,4 \pm 6,8^f$	$5,1 \pm 1,4^{ab}$	$1,07 \pm 0,27^a$	$67,9 \pm 7,8^c$	$47,0 \pm 4,7^{bcd}$
Agosto	$39,5 \pm 26,7^{ef}$	$4,4 \pm 3,6^{bc}$	$0,59 \pm 0,43^{bcd}$	$80,2 \pm 21,7^{abc}$	$46,0 \pm 12,1^d$
Septiembre	$48,2 \pm 13,6^{cde}$	$5,6 \pm 2,3^{ab}$	$0,71 \pm 0,23^{abc}$	$80,0 \pm 16,4^{abc}$	$49,4 \pm 3,6^{abcd}$
Octubre	$52,8 \pm 15,4^{cde}$	$3,8 \pm 1,5^{abc}$	$0,52 \pm 0,19^{abcd}$	$84,2 \pm 9,2^{abc}$	$58,2 \pm 12,7^{ab}$
Diciembre	$63,1 \pm 28,5^{bcd}$	$3,9 \pm 2,9^{bc}$	$0,55 \pm 0,33^{bcd}$	$89,0 \pm 15,2^{ab}$	$47,7 \pm 6,2^{bcd}$
2009					
Marzo	$81,8 \pm 25,7^{abc}$	$4,9 \pm 2,8^{ab}$	$0,63 \pm 0,37^{abc}$	$96,6 \pm 9,1^a$	$55,4 \pm 5,3^{abc}$
Abril	$84,5 \pm 40,0^{abc}$	$6,0 \pm 5,1^{ab}$	$0,78 \pm 0,60^{abc}$	$97,1 \pm 23,1^{ab}$	$50,7 \pm 6,0^{abcd}$
Mayo	$44,0 \pm 26,5^{def}$	$2,0 \pm 2,0^d$	$0,36 \pm 0,32^d$	$75,4 \pm 16,2^{bc}$	$45,4 \pm 5,6^{cd}$
Junio	$93,0 \pm 78,3^{abc}$	$11,0 \pm 11,5^a$	$1,48 \pm 1,51^a$	$91,2 \pm 27,0^{ab}$	$61,4 \pm 17,7^a$
Agosto	$92,4 \pm 18,1^{ab}$	$8,4 \pm 3,8^a$	$0,98 \pm 0,50^{ab}$	$95,5 \pm 11,9^{ab}$	$59,6 \pm 8,2^a$
Septiembre	$102,1 \pm 27,6^a$	$5,6 \pm 3,4^{ab}$	$0,74 \pm 0,55^{abc}$	$97,9 \pm 12,7^a$	$60,2 \pm 10,4^a$
Octubre	$78,4 \pm 24,5^{abc}$	$4,0 \pm 2,8^{bc}$	$0,45 \pm 0,29^{cd}$	$95,0 \pm 15,5^{ab}$	$50,1 \pm 5,3^{abcd}$

*Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK y Kruskal-Wallis, Mann-Whitney).

6.3.2.2. Cuerdas

El peso total, peso fresco de la carne, peso seco estandarizado, longitud y anchura de las ostras cultivadas bajo el sistema de cuerdas fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$, ANOVA y Kruskal-Wallis) en relación a la fecha de muestreo (Tabla 6.2).

En todas las medidas biométricas evaluadas los valores fueron significativamente superiores en el muestreo de octubre de 2009, mientras que los valores significativamente más bajos fueron observados en el muestreo de abril de 2008 ($P < 0,05$, ANOVA, SNK y Kruskal-Wallis, Mann-Whitney).

Tabla 6.2. Medidas biométricas en Crassostrea gigas cultivada en cuerdas en la Ría de Arousa, entre enero de 2008 y octubre de 2009. Los datos de peso total, peso fresco de la carne y peso seco estandarizado aparecen expresados en g.ind⁻¹ (± de) y los datos de longitud y anchura aparecen expresados en cm (± de).

Meses	Peso total (g.ind ⁻¹)	Peso fresco carne (g.ind ⁻¹)	Peso seco estandarizado (g.ind ⁻¹)	Longitud (cm)	Anchura (cm)
2008					
Abril	4,4 ± 1,1 ^g	0,3 ± 0,1 ^j	0,15 ± 0,03 ^g	35,2 ± 6,1 ⁱ	21,8 ± 3,0 ^g
Mayo	11,0 ± 1,2 ^f	2,4 ± 0,2 ⁱ	1,27 ± 0,09 ^f	41,7 ± 4,3 ^h	39,6 ± 3,8 ^f
Junio	25,7 ± 4,2 ^e	5,4 ± 0,8 ^h	2,23 ± 0,40 ^e	57,8 ± 6,5 ^g	52,2 ± 5,4 ^e
Agosto	47,9 ± 8,8 ^d	9,8 ± 1,8 ^g	2,85 ± 0,67 ^d	69,0 ± 6,6 ^f	63,6 ± 11,4 ^d
Septiembre	78,3 ± 17,1 ^c	13,9 ± 3,8 ^{ef}	3,38 ± 1,01 ^c	82,7 ± 7,5 ^e	67,3 ± 5,5 ^{cd}
Octubre	99,8 ± 16,4 ^c	19,5 ± 3,1 ^{cd}	4,36 ± 0,73 ^{bc}	90,0 ± 9,1 ^{de}	72,7 ± 6,3 ^{bcd}
Diciembre	96,7 ± 15,9 ^c	15,7 ± 2,8 ^{def}	4,17 ± 0,98 ^{bc}	87,8 ± 3,5 ^{de}	69,8 ± 7,0 ^{cd}
2009					
Marzo	92,9 ± 17,7 ^c	12,4 ± 4,0 ^{fg}	2,42 ± 0,71 ^{de}	96,5 ± 12,0 ^{bcd}	67,8 ± 6,6 ^{cd}
Abril	98,9 ± 22,9 ^c	16,7 ± 3,9 ^{de}	3,61 ± 0,88 ^c	98,1 ± 11,5 ^{bd}	75,5 ± 9,8 ^{abc}
Mayo	144,9 ± 26,3 ^b	25,0 ± 3,8 ^{bc}	4,77 ± 0,74 ^b	111,8 ± 11,4 ^{abc}	76,7 ± 6,0 ^{abc}
Junio	157,5 ± 19,4 ^b	31,3 ± 4,4 ^{ab}	5,92 ± 0,97 ^a	111,4 ± 8,4 ^{abc}	78,4 ± 5,0 ^{abc}
Agosto	153,0 ± 51,1 ^b	24,3 ± 8,9 ^c	4,65 ± 1,24 ^b	110,4 ± 15,6 ^{ac}	74,0 ± 9,3 ^{abcd}
Septiembre	222,9 ± 72,9 ^a	35,4 ± 9,1 ^a	6,30 ± 1,51 ^a	123,1 ± 22,3 ^a	81,9 ± 8,2 ^{ab}
Octubre	255,9 ± 68,8 ^a	41,7 ± 12,6 ^a	6,44 ± 2,12 ^a	127,6 ± 18,1 ^a	84,1 ± 8,0 ^a

*Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK y Kruskal-Wallis, Mann-Whitney).

6.3.3. Composición bioquímica

6.3.3.1. Jaulas

Los datos de la composición bioquímica general en contenido total y en porcentaje en relación a la materia orgánica (MO) de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* cultivada en jaulas en la Ría de Arousa se muestra en la tabla 6.3. Estos datos representan el promedio (\pm de) de todos los organismos en cada muestreo sin tener en cuenta la diferenciación sexual.

El contenido en materia orgánica (MO) de la ostra *C. gigas* varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a la fecha de muestreo (Tabla 6.3). El valor significativamente más alto ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) del contenido en MO fue observado en el muestreo de junio de 2008 ($949,3 \pm 249,9$ mg.ind⁻¹) y el más bajo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el muestreo de abril de 2008 ($119,0 \pm 22,6$ mg.ind⁻¹).

El principal componente de las ostras cultivadas en el sistema de jaulas fueron las proteínas, que representan del 42,6% de la MO observado en agosto de 2008 hasta el 59,0% en mayo de 2009. Los carbohidratos representan del 6,2% de la MO observado en octubre de 2009 hasta el 30,5% observado en mayo de 2008. Los lípidos, representan en porcentaje el tercer componente de mayor importancia de la MO, con valores desde el 11,0% observado en agosto de 2008 hasta el 27,9% observado en octubre de 2009. El glucógeno alcanza valores que oscilaron entre el 3,0% y el 15,8% (Tabla 6.3).

La cantidad total de proteínas (mg.ind⁻¹) avanza significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) con la fecha de muestreo y con el desarrollo gonadal de la ostra, alcanzando los valores más altos significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en los muestreos de junio de 2008 y agosto de 2009 ($417,7 \pm 90,2$ y $411,4 \pm 192,9$ mg.ind⁻¹, respectivamente), mientras que los mínimos fueron encontrados en el primer muestreo (Tabla 6.3).

La concentración de carbohidratos (mg.ind⁻¹) en los tejidos de las ostras varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a los meses de muestreo (Tabla 6.3). El valor significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) más alto de carbohidratos se encontró en el mes de junio de 2008 ($239,6 \pm 104,5$ mg.ind⁻¹), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontraron en el muestreo de abril de 2008 ($8,2 \pm 4,1$ mg.ind⁻¹) (Tabla 6.3).

La evolución de la cantidad total de glucógeno (mg.ind⁻¹) se asemeja a la evolución del contenido total de carbohidratos, con valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en abril de 2008 ($3,6 \pm 1,4$ mg.ind⁻¹) y valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el mes de junio de 2008 ($155,2 \pm 65,1$ mg.ind⁻¹) (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Composición bioquímica general de *Crassostrea gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo el sistema de jaulas, entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los datos aparecen expresados en mg.ind⁻¹(± de) y en porcentaje relativo al total de materia orgánica (%MO).

Meses	MO		Proteínas		Carbohidratos		Glucógeno		Lípidos	
	mg.ind ⁻¹		mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO
2008										
Abril	119,0 ± 22,6 ^f		64,9 ± 9,00 ^f	55,0 ± 4,5 ^{ab}	8,2 ± 4,1 ^f	6,6 ± 2,1 ^d	3,6 ± 1,4 ^g	3,0 ± 0,9 ^{de}	17,1 ± 5,3 ^f	14,1 ± 1,8 ^{cd}
Mayo	504,7 ± 180,2 ^{bcd}		208,6 ± 56,7 ^{bcd}	42,7 ± 6,1 ^f	163,3 ± 95,7 ^{ab}	30,5 ± 9,5 ^a	82,1 ± 41,4 ^{ab}	15,4 ± 3,4 ^a	70,3 ± 29,0 ^{cde}	14,3 ± 4,2 ^{cd}
Junio	949,3 ± 249,9 ^a		417,7 ± 90,2 ^a	44,9 ± 6,2 ^{ef}	239,6 ± 104,5 ^a	24,8 ± 6,4 ^{ab}	155,2 ± 65,1 ^a	15,8 ± 3,7 ^a	210,3 ± 59,3 ^a	22,6 ± 4,6 ^{ab}
Agosto	592,3 ± 384,5 ^{abcd}		237,4 ± 130,8 ^{bcd}	42,6 ± 6,8 ^f	155,3 ± 152,8 ^{abc}	21,5 ± 9,7 ^{abc}	75,8 ± 84,9 ^{abc}	10,2 ± 5,7 ^{ab}	66,9 ± 51,5 ^{cde}	11,0 ± 2,6 ^d
Septiembre	589,5 ± 213,4 ^{abc}		280,5 ± 94,7 ^{abc}	47,8 ± 4,8 ^{cdef}	184,0 ± 148,6 ^{ab}	28,8 ± 15,8 ^{ab}	52,9 ± 41,6 ^{bcd}	8,5 ± 5,3 ^{bc}	103,1 ± 30,8 ^{abc}	17,9 ± 2,2 ^{bc}
Octubre	409,9 ± 156,8 ^{cd}		201,1 ± 72,8 ^{bcde}	49,4 ± 4,8 ^{bcde}	36,0 ± 21,7 ^{bcdef}	8,2 ± 2,1 ^d	20,1 ± 13,2 ^{cdef}	4,5 ± 1,5 ^{bcde}	64,5 ± 34,7 ^{cde}	15,4 ± 3,0 ^{cd}
Diciembre	343,0 ± 120,1 ^{cde}		157,9 ± 57,9 ^{cde}	45,8 ± 1,1 ^{def}	30,2 ± 22,7 ^{cdef}	8,0 ± 3,7 ^d	22,7 ± 11,5 ^{bcde}	6,3 ± 1,1 ^{bcde}	49,8 ± 27,5 ^{de}	13,6 ± 3,7 ^{cd}
2009										
Marzo	352,9 ± 76,0 ^{cde}		172,6 ± 37,2 ^{bcde}	49,2 ± 5,1 ^{bcde}	27,1 ± 7,6 ^{cdef}	7,6 ± 1,1 ^d	10,4 ± 3,1 ^{defg}	2,9 ± 0,5 ^{de}	57,2 ± 20,2 ^{cde}	16,0 ± 3,0 ^{bcd}
Abril	543,7 ± 388,5 ^c		279,9 ± 37,2 ^{abc}	52,7 ± 2,7 ^{bc}	103,0 ± 137,3 ^{bcde}	13,3 ± 10,8 ^{cd}	65,4 ± 84,7 ^{bc}	9,2 ± 4,7 ^b	107,4 ± 80,7 ^{bcd}	19,7 ± 6,0 ^{bc}
Mayo	226,8 ± 147,8 ^{ef}		132,3 ± 80,8 ^e	59,0 ± 4,9 ^a	20,5 ± 24,8 ^{def}	7,1 ± 4,0 ^d	10,1 ± 9,7 ^{efg}	3,9 ± 1,4 ^{cde}	37,5 ± 17,8 ^e	19,4 ± 7,8 ^{bc}
Junio	743,5 ± 523,0 ^{abc}		399,8 ± 269,7 ^{ab}	54,9 ± 3,3 ^{ab}	197,9 ± 217,6 ^{abc}	20,9 ± 11,4 ^{abc}	111,2 ± 141,3 ^{abc}	10,8 ± 8,4 ^{ab}	167,6 ± 139,5 ^{abc}	20,4 ± 7,2 ^{bc}
Agosto	848,6 ± 468,7 ^{ab}		411,4 ± 192,9 ^a	50,0 ± 3,4 ^{bcde}	193,9 ± 192,0 ^{ab}	18,9 ± 9,6 ^{bc}	95,5 ± 101,0 ^{ab}	9,0 ± 5,2 ^b	186,3 ± 171,7 ^{ab}	20,0 ± 6,7 ^{bc}
Septiembre	695,5 ± 494,3 ^{abc}		339,5 ± 217,3 ^{ab}	51,2 ± 5,6 ^{bcd}	148,6 ± 186,4 ^{abcd}	14,6 ± 11,4 ^{cd}	100,5 ± 130,3 ^{bcd}	8,6 ± 8,3 ^{bcd}	199,8 ± 155,7 ^{ab}	27,8 ± 2,4 ^a
Octubre	282,4 ± 126,1 ^{de}		145,3 ± 63,1 ^{de}	51,5 ± 2,7 ^{bcd}	22,4 ± 25,6 ^{ef}	6,2 ± 4,7 ^d	8,6 ± 8,5 ^{fg}	2,5 ± 1,9 ^e	84,6 ± 59,4 ^{cd}	27,9 ± 7,1 ^a

*Letras diferentes indican diferencia significativa (P<0,05, ANOVA, SNK).

La concentración de lípidos totales (mg.ind^{-1}) en los tejidos de las ostras varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a los meses de muestreo (Tabla 6.3). Los valores significativamente más altos de lípidos totales ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron encontrados en el mes de junio de 2008 ($210,3 \pm 59,3 \text{ mg.ind}^{-1}$), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontraron en abril de 2008 ($17,1 \pm 5,3 \text{ mg.ind}^{-1}$) (Tabla 6.3).

6.3.3.2. Cuerdas

La composición bioquímica general de los tejidos blandos y el contenido en materia orgánica (MO) de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* cultivada en cuerdas se muestra en la Tabla 6.4. Estos datos representan el promedio (\pm de) de todos los organismos en cada muestreo sin tener en cuenta la diferenciación sexual.

Los datos del contenido en materia orgánica (MO) de la ostra *C. gigas* presentaron diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a la fecha de muestreo (Tabla 6.4). Los valores del contenido en materia orgánica más altos significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron registrados en el muestreo de septiembre de 2009 ($5847,3 \pm 1457,6 \text{ mg.ind}^{-1}$) y el más bajo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el muestreo de abril de 2008 ($119,0 \pm 22,7 \text{ mg.ind}^{-1}$).

Las ostras cultivadas en cuerdas presentan como componentes mayoritarios dentro de la MO, las proteínas y los carbohidratos, no presentando diferencias significativas entre los porcentajes. Los carbohidratos presentan valores promedios que varían desde el 6,6% observado en el muestreo de abril de 2008 hasta el 51,7% en el muestreo de octubre de 2009 y las proteínas presentan valores desde el 33,5% en diciembre de 2008 hasta el 55,0% en abril de 2008. Los lípidos aparecen como el tercero componente de mayor porcentaje dentro de la MO con valores desde el 14,1% en abril de 2008 hasta el 40,4% en octubre de 2009. El glucógeno presenta porcentajes desde el 3,0% en abril de 2008 hasta el 32,7% en octubre de 2008 (Tabla 6.4).

La cantidad total de proteínas (mg.ind^{-1}) aumenta significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) con la fecha de muestreo alcanzando los valores más altos significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en los muestreos de junio y septiembre 2009 ($2394,6 \pm 512,1$ y $2245,1 \pm 471,7 \text{ mg.ind}^{-1}$), mientras que los mínimos fueron encontrados en abril de 2008 ($64,9 \pm 9,0 \text{ mg.ind}^{-1}$) (Tabla 6.4).

Los carbohidratos (mg.ind^{-1}) presentes en los tejidos de las ostras presentaron valores significativamente distintos ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a los meses de muestreo (Tabla 6.4). El valor significativamente más alto ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) de carbohidratos se encontró en el mes de octubre de 2009 ($3207,1 \pm 1787,3 \text{ mg.ind}^{-1}$), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontraron en abril de 2008 ($8,2 \pm 4,1 \text{ mg.ind}^{-1}$) (Tabla 6.4).

Los datos de la cantidad total de glucógeno (mg.ind^{-1}) tienen una evolución semejante a los datos del contenido total de carbohidratos, con valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en abril de 2008 ($3,6 \pm 1,4 \text{ mg.ind}^{-1}$) y valores significativamente más altos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) en el mes de octubre de 2009 ($1999,8 \pm 1366,3 \text{ mg.ind}^{-1}$) (Tabla 6.4).

La concentración de lípidos totales (mg.ind^{-1}) en los tejidos de las ostras varió significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) en relación a los meses de muestreo (Tabla 6.4). Los valores significativamente más altos de lípidos totales ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) fueron encontrados en el mes de octubre de 2009 ($2588,1 \pm 1742,8 \text{ mg.ind}^{-1}$), mientras que los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) se encontraron en abril de 2008 ($17,1 \pm 5,3 \text{ mg.ind}^{-1}$) (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Composición bioquímica general de *Crassostrea gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo el sistema de cuerdas, entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los datos aparecen expresados en mg.ind⁻¹(± de) y en porcentaje relativo al total de materia orgánica (%MO).

Meses	MO	Proteínas		Carbohidratos		Glucógeno		Lípidos	
	mg.ind ⁻¹	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO	mg.ind ⁻¹	%MO
2008									
Abril	119,0 ± 22,7 ^g	64,9 ± 9,0 ^f	55,0 ± 4,5 ^a	8,2 ± 4,1 ^f	6,6 ± 2,1 ^c	3,6 ± 1,4 ^f	3,0 ± 0,9 ^d	17,1 ± 5,3 ^f	14,1 ± 1,8 ^f
Mayo	1177,3 ± 87,9 ^f	542,4 ± 25,3 ^e	46,2 ± 3,7 ^b	381,6 ± 63,5 ^e	32,3 ± 3,4 ^b	209,3 ± 30,4 ^e	17,8 ± 1,9 ^c	192,8 ± 42,5 ^e	16,5 ± 3,8 ^f
Junio	2081,2 ± 381,6 ^e	781,9 ± 154,5 ^d	38,2 ± 7,7 ^{cd}	905,0 ± 319,7 ^d	43,2 ± 12,7 ^{ab}	444,5 ± 219,5 ^d	20,9 ± 8,6 ^c	374,5 ± 155,8 ^d	17,7 ± 5,4 ^{ef}
Agosto	2646,7 ± 634,1 ^e	1210,5 ± 289,6 ^c	45,8 ± 5,1 ^b	1201,7 ± 437,3 ^{cd}	43,8 ± 9,7 ^{ab}	552,8 ± 281,6 ^d	20,1 ± 7,6 ^c	721,3 ± 268,2 ^c	26,9 ± 6,4 ^{cd}
Septiembre	3422,9 ± 963,1 ^d	1407,6 ± 291,9 ^c	42,5 ± 8,0 ^{bc}	1664,1 ± 781,5 ^{bc}	47,6 ± 14,5 ^a	855,1 ± 401,4 ^c	24,2 ± 6,9 ^{bc}	1194,2 ± 483,9 ^{abc}	34,3 ± 6,8 ^{abcd}
Octubre	4041,6 ± 696,2 ^{cd}	1354,1 ± 251,7 ^c	33,6 ± 4,4 ^d	1992,4 ± 682,2 ^{ab}	48,4 ± 9,7 ^a	1364,7 ± 593,0 ^{ab}	32,7 ± 9,4 ^a	1176,9 ± 500,8 ^{abc}	28,2 ± 8,1 ^{bcd}
Diciembre	3836,0 ± 891,7 ^{cd}	1263,3 ± 261,2 ^c	33,5 ± 5,0 ^d	1605,9 ± 517,6 ^{bc}	41,2 ± 6,0 ^{ab}	945,7 ± 332,9 ^{bc}	24,0 ± 4,3 ^{bc}	680,2 ± 243,1 ^c	17,6 ± 4,3 ^{ef}
2009									
Marzo	2210,7 ± 677,1 ^e	921,6 ± 217,1 ^d	42,4 ± 4,6 ^{bc}	970,5 ± 475,9 ^d	42,2 ± 9,1 ^{ab}	477,3 ± 265,0 ^d	20,6 ± 6,3 ^c	805,6 ± 387,8 ^c	35,1 ± 7,7 ^{abc}
Abril	3341,1 ± 838,0 ^d	1565,6 ± 361,8 ^{bc}	47,4 ± 4,7 ^b	1581,5 ± 740,4 ^{bc}	46,4 ± 15,6 ^a	911,8 ± 406,8 ^{bc}	26,7 ± 8,7 ^{abc}	1255,1 ± 393,6 ^{abc}	37,1 ± 5,2 ^{ab}
Mayo	4453,2 ± 710,8 ^{bc}	2058,8 ± 406,5 ^{ab}	46,5 ± 8,0 ^b	2059,7 ± 645,2 ^{ab}	46,0 ± 10,3 ^a	1186,5 ± 237,8 ^{abc}	26,9 ± 5,0 ^{abc}	1661,8 ± 590,4 ^{ab}	37,0 ± 9,3 ^{ab}
Junio	5529,7 ± 922,1 ^{ab}	2394,6 ± 512,1 ^a	43,7 ± 8,7 ^{bc}	2451,1 ± 937,0 ^{ab}	43,9 ± 15,0 ^{ab}	1633,9 ± 759,4 ^a	29,2 ± 12,2 ^{ab}	1747,0 ± 680,5 ^{ab}	31,3 ± 11,1 ^{abcd}
Agosto	4329,4 ± 1186,6 ^{cd}	1654,0 ± 618,7 ^{bc}	38,1 ± 7,0 ^{cd}	1998,6 ± 755,8 ^{ab}	45,5 ± 11,6 ^a	1121,3 ± 660,3 ^{abc}	24,9 ± 11,0 ^{abc}	1153,6 ± 595,8 ^{bc}	25,4 ± 9,3 ^{de}
Septiembre	5847,3 ± 1457,6 ^a	2245,1 ± 471,7 ^a	40,0 ± 11,0 ^{bcd}	2356,7 ± 948,1 ^{ab}	40,2 ± 13,8 ^{ab}	1626,9 ± 887,8 ^{ab}	26,9 ± 11,7 ^{abc}	1973,6 ± 862,9 ^{ab}	33,1 ± 9,4 ^{abcd}
Octubre	5858,2 ± 2071,3 ^{ab}	1936,5 ± 490,5 ^{ab}	34,5 ± 6,5 ^d	3207,1 ± 1787,3 ^a	51,7 ± 11,2 ^a	1999,8 ± 1366,3 ^a	31,0 ± 13,1 ^{ab}	2588,1 ± 1742,8 ^a	40,4 ± 19,7 ^a

*Letras diferentes indican diferencia significativa (P<0,05, ANOVA, SNK).

6.3.4. Comparación entre sistemas de cultivo

Este apartado presenta los resultados de la evolución de los principales componentes bioquímicos (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos) de los tejidos de la ostra japonesa *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa, poniendo en evidencia las diferencias existentes entre los distintos sistemas de cultivo en jaulas y cuerdas en la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas.

6.3.4.1. Contenido en materia orgánica

El contenido en materia orgánica (MO) expresado en $\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$ de la ostra *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa presentó diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo, con una superioridad del sistema de cuerdas sobre el sistema de jaulas (Figura 6.7, Tablas 6.3 y 6.4).

Con relación a la evolución del contenido en MO en relación a los meses de muestreo, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo, con valores superiores en el sistema de cuerdas en todos los meses de muestreo (Figura 6.7, Tablas 6.3 y 6.4).

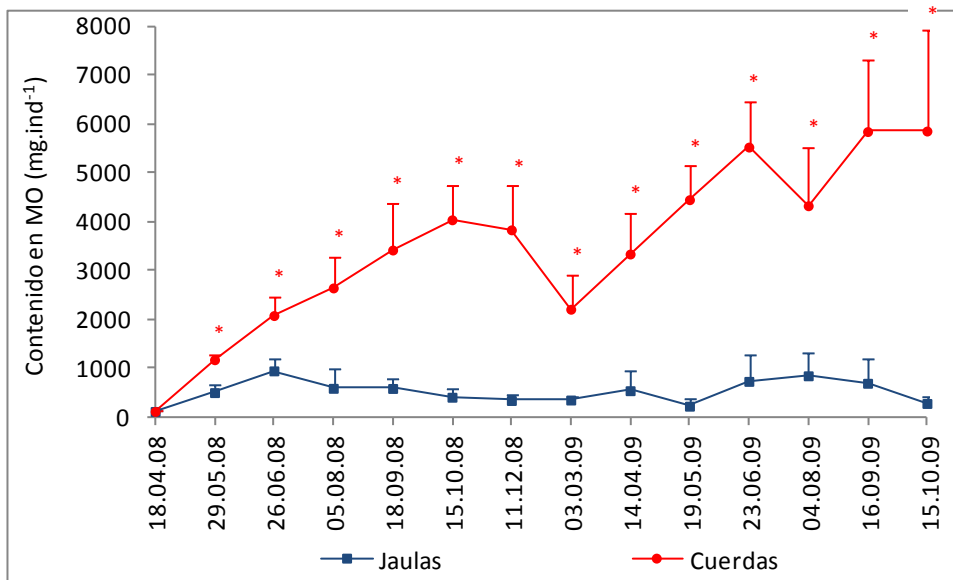


Figura 6.7. Evolución del contenido medio en MO ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$ + de) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

6.3.4.2. Proteínas

La evolución de las proteínas en contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y en porcentaje dentro de la MO (Figuras 6.8 y 6.9, Tablas 6.3 y 6.4) presentan valores diferentes significativamente ($P<0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo. Con relación al contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$), las ostras cultivadas en cuerdas presentan valores significativamente superiores ($P<0,05$, ANOVA). Por otro lado, cuando evaluado el porcentaje de proteínas dentro de la MO, las ostras cultivadas en el sistema de jaulas presentan porcentajes superiores significativamente ($P<0,05$, ANOVA).

Las ostras cultivadas en los sistemas de jaulas y cuerdas presentan valores en contenido total y en porcentaje dentro de la MO significativamente diferentes ($P<0,05$, ANOVA) en función de la fecha de muestreo. Cuando evaluada la evolución de los datos de proteínas en contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$), se ha podido observar que las ostras cultivadas en cuerdas presentan valores significativamente más altos ($P<0,05$, ANOVA) en todos los meses de cultivo (Figura 6.8). Sin embargo, cuando evaluamos los datos del porcentaje de proteínas dentro de la MO, no se han observado diferencias significativas ($P>0,05$, ANOVA) entre los meses de mayo y septiembre de 2008. A partir del mes de octubre de 2008 hasta el final del cultivo, las ostras cultivadas en jaulas presentaron valores significativamente ($P<0,05$, ANOVA) más elevados (Figura 6.9).

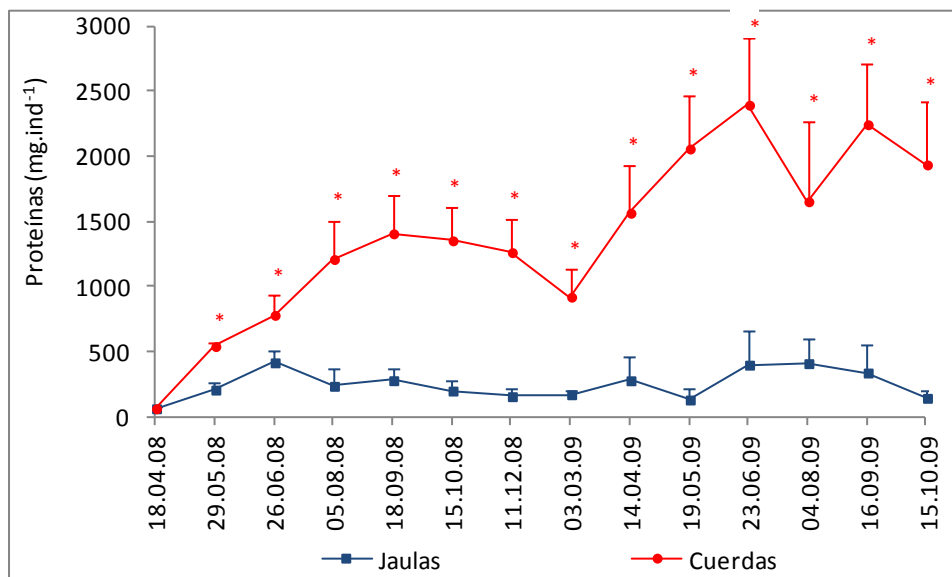


Figura 6.8. Evolución del contenido total de proteínas ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$ + de) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P<0,05$, ANOVA).

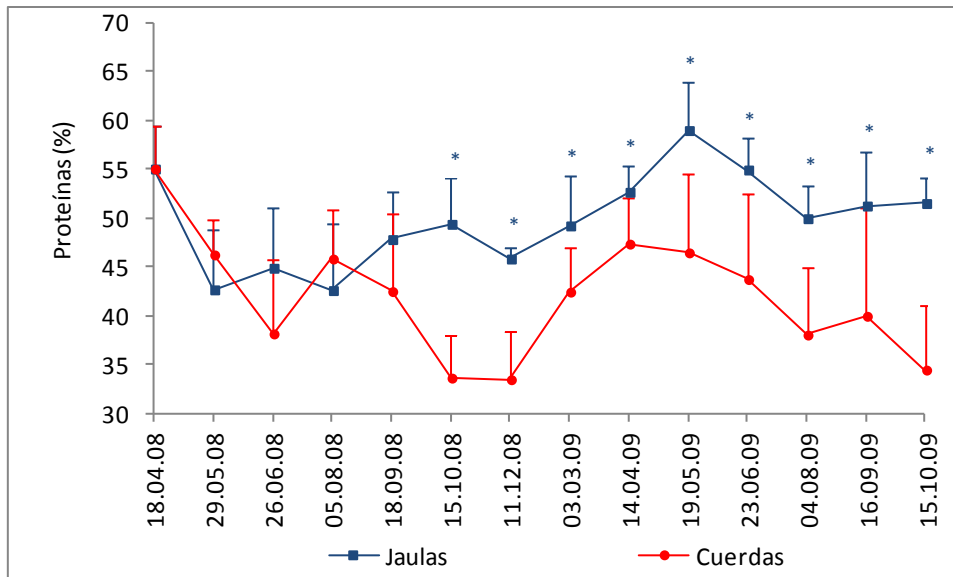


Figura 6.9. Evolución del porcentaje de proteínas dentro de la MO de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Valor medio + de Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

6.3.4.3. Carbohidratos

Los valores de carbohidratos expresados en contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) y en porcentaje dentro de la MO presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo de jaulas y cuerdas (Figuras 6.10 y 6.11, Tablas 6.3 y 6.4). El sistema de cuerdas fue significativamente ($P < 0,05$, ANOVA) superior al sistema de jaulas tanto en contenido total cuanto en porcentaje dentro de la MO.

Cuando evaluado el efecto de la fecha de muestreo sobre la evolución del contenido total y del porcentaje de carbohidratos dentro de la MO, se ha podido observar una superioridad significativa del sistema de cuerdas ($P < 0,05$, ANOVA) en todos los meses de muestreo para ambas las medidas. La única excepción observada, fue en el muestreo de mayo de 2008 donde no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo para los datos del porcentaje de carbohidratos dentro de la MO (Figura 6.11).

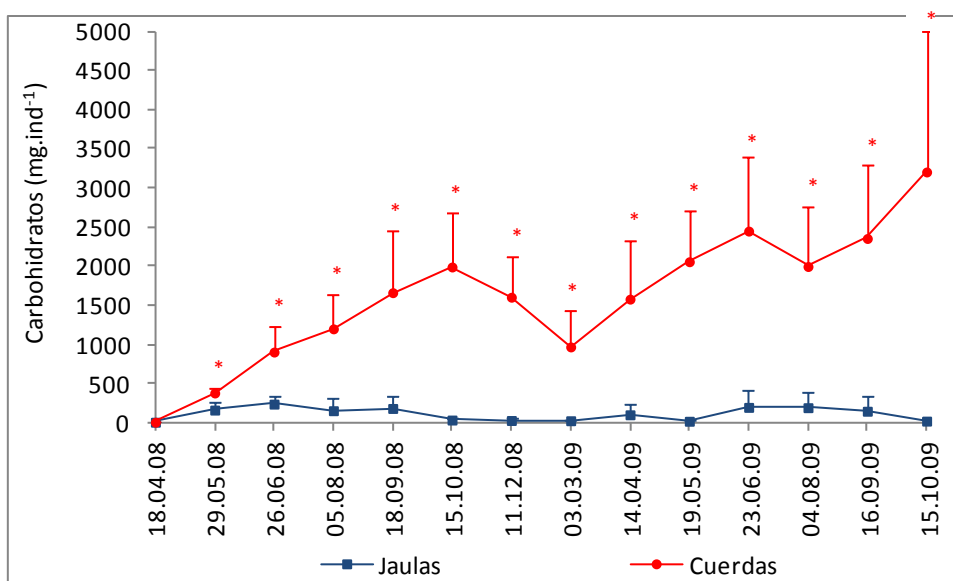


Figura 6.10. Evolución del contenido total de carbohidratos (mg.ind⁻¹ + de) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

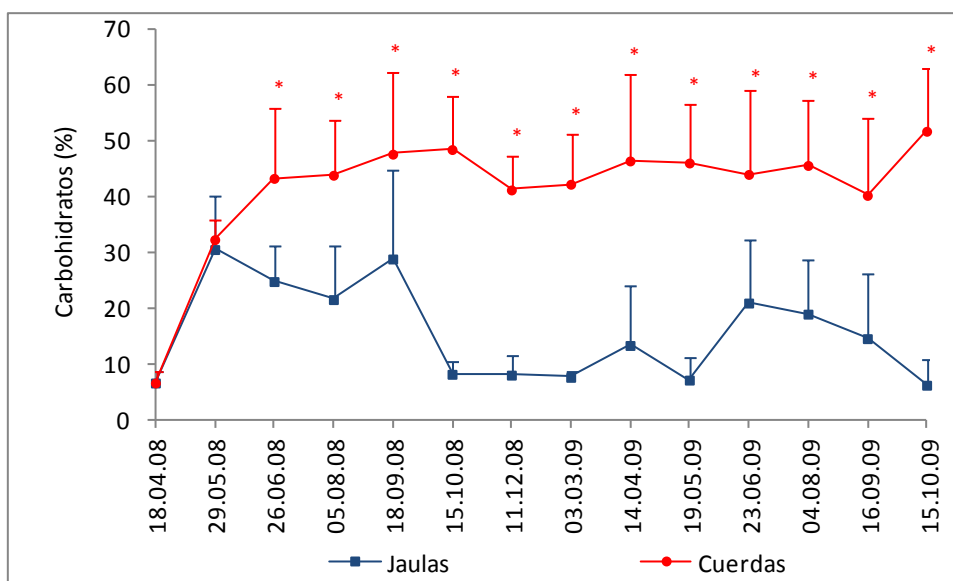


Figura 6.11. Evolución del porcentaje de carbohidratos dentro de la MO de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Valor medio + de. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

6.3.4.4. Glucógeno

La evolución del glucógeno en contenido total (mg.ind⁻¹) y en porcentaje dentro de la MO (Figuras 6.12 y 6.13, Tablas 6.3 y 6.4) se asemeja a la evolución de los carbohidratos, sin embargo con valores inferiores. Como observado en los carbohidratos, los datos de glucógeno

también presentan diferencia significativa ($P < 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo evaluados, con una superioridad del sistema de cuerdas para ambas las mediciones.

El sistema de cuerdas permitió un mayor acumulo de glucógeno tanto en contenido total cuanto en porcentaje dentro de la MO, lo que conlleva a una superioridad significativa ($P < 0,05$, ANOVA) de los datos de glucógeno presentados por las ostras cultivadas en las cuerdas en todos los meses de cultivo. Las únicas excepciones fueron observadas en los meses de mayo y junio de 2008 donde no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA) para los datos del porcentaje de glucógeno dentro de la MO (Figura 6.13).

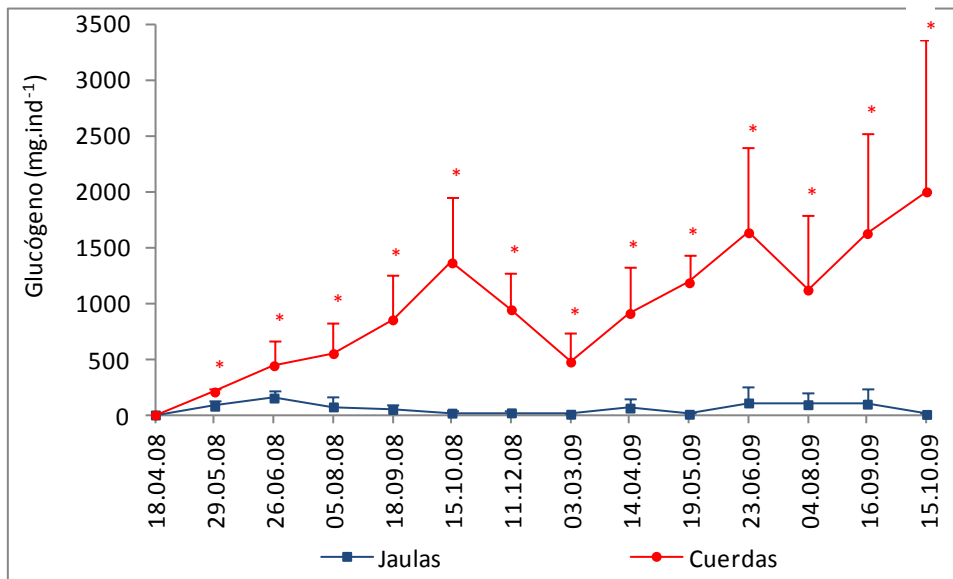


Figura 6.12. Evolución del contenido total de glucógeno ($\text{mg.ind}^{-1} + \text{de}$) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

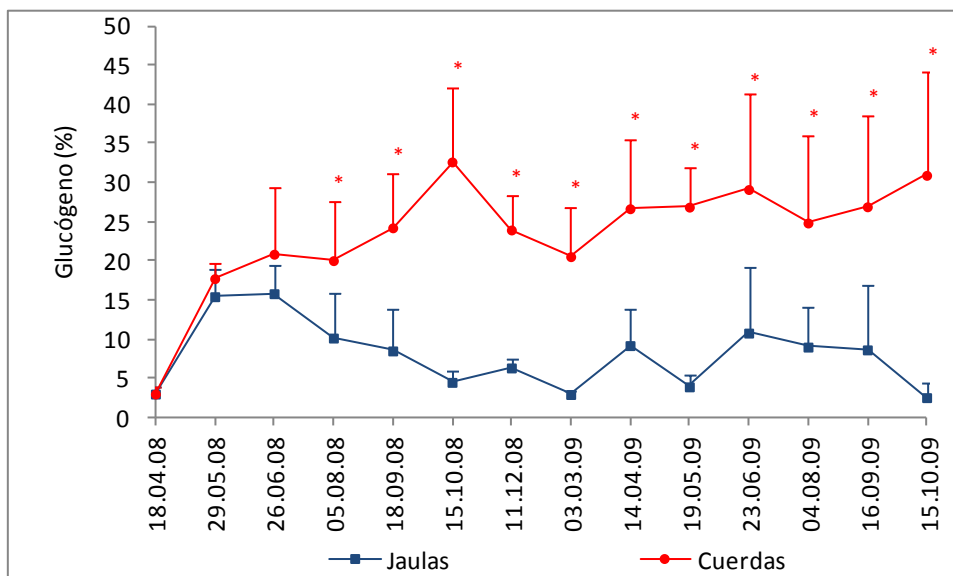


Figura 6.13. Evolución del porcentaje de glucógeno dentro de la MO de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Valor medio + de. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

6.3.4.5. Lípidos

Los lípidos presentan valores en contenido total (mg.ind^{-1}) y en porcentaje dentro de la MO que difieren significativamente entre los sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA), con una superioridad del sistema de cuerdas para ambas las medidas (Figuras 6.14 y 6.15, Tablas 6.3 y 6.4).

Con relación a la fecha de muestreo, el sistema de cuerdas posibilitó un mayor acumulo significativo ($P < 0,05$, ANOVA) de lípidos en contenido total en todos los meses de muestreo (Figura 6.14). Cuando evaluada la evolución mensual de los valores del porcentaje de lípidos dentro de la MO, se ha podido observar que en los dos primeros meses de muestreo no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo, sin embargo, entre los meses de agosto y octubre de 2008 y marzo y mayo de 2009 el sistema de cuerdas presentó porcentajes significativamente superiores ($P < 0,05$, ANOVA). Entre junio y octubre de 2009, los valores del porcentaje de lípidos dentro de la MO no difirieron significativamente ($P > 0,05$, ANOVA) entre los sistemas de cultivo (Figura 6.15).

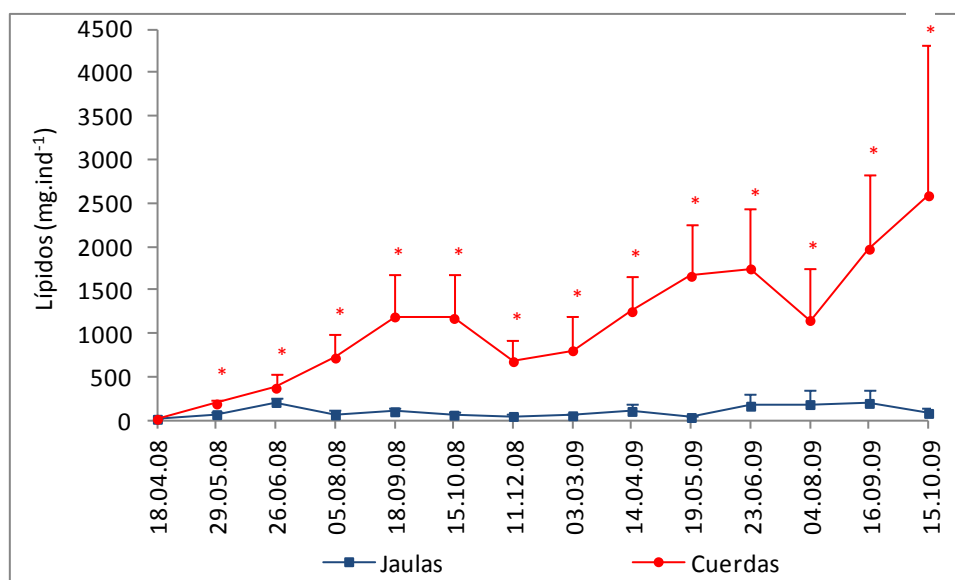


Figura 6.14. Evolución del contenido total de lípidos (mg.ind^{-1} + de) de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

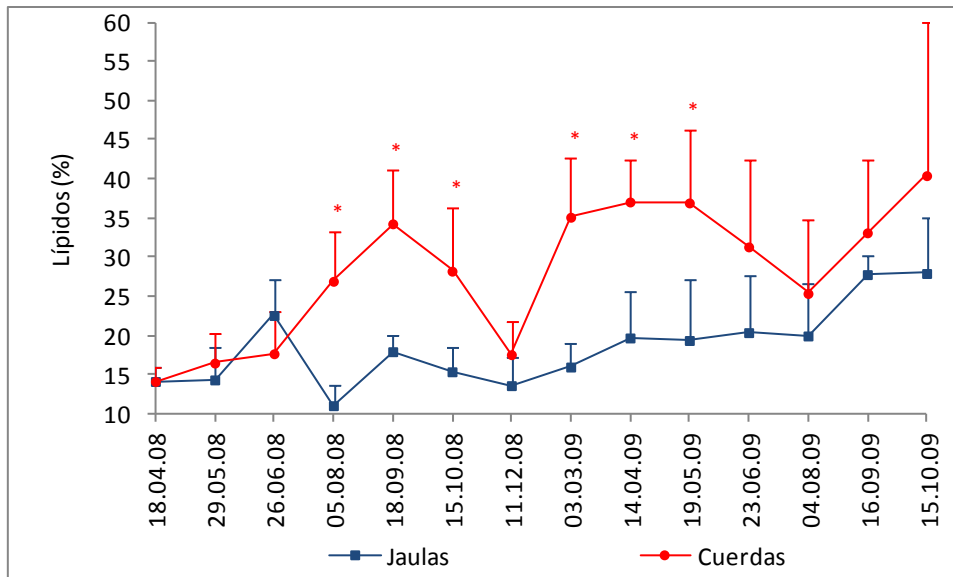


Figura 6.15. Evolución del porcentaje de lípidos dentro de la MO de *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa bajo los sistemas de jaulas y cuerdas entre abril de 2008 y octubre de 2009. Valor medio + de. Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, ANOVA).

6.3.5. Variables ambientales

La evolución de la temperatura y clorofila *a* están representadas en la figura 6.16, donde se puede observar un ciclo estacional evidente para la temperatura, con un incremento a partir de la primavera alcanzando el máximo de 18,6 °C en 2008 y 19,9 °C en 2009, siendo ambos los valores registrados en el mes de julio. Posterior a este período, hay una disminución durante el otoño llegando al mínimo de 11,8 °C en 2008 y 13,5 °C en 2009.

La clorofila *a* ha presentado dos picos durante el año de 2008, uno en primavera (28/04) con 3,4 µg/l y el otro en otoño (22/09) con 3,1 µg/l. En el año de 2009, la evolución de la clorofila *a* fue distinta al año anterior, presentando valores elevados en finales de invierno, con 1,9 µg/l en 16/03, y durante toda la primavera. En principios de otoño (28/09) se ha observado, como en el año anterior, un pico con 2,8 µg/l de clorofila *a*.

La salinidad ha sido muy constante durante todo el periodo de estudio, presentando un valor medio de $34,5 \pm 1,3\%$.

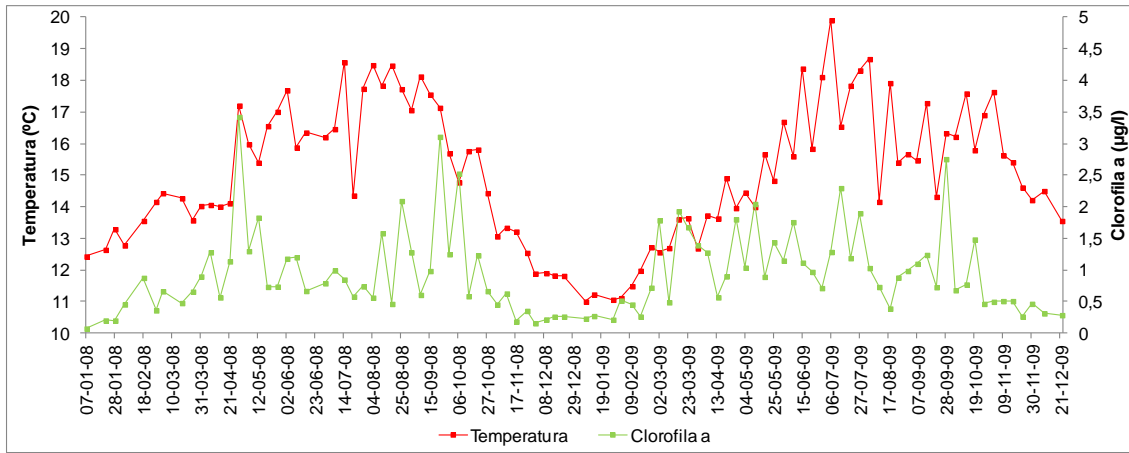


Figura 6.16. Evolución de los valores de temperatura y clorofila a en el Polígono A7 de O Grove, Ría de Arousa, durante el periodo de estudio.

6.4. DISCUSIÓN

El presente capítulo evaluó el efecto de los sistemas de cultivo en jaulas y en cuerdas sobre la evolución de los componentes bioquímicos principales de la ostra japonesa cultivada en batea en la Ría de Arousa y verificó diferencias significativas entre los dos sistemas utilizados. Con relación a la evolución del contenido en materia orgánica, se ha podido verificar una superioridad significativa ($P < 0,05$, ANOVA) del cultivo en cuerdas en todos los meses de muestreo, llegando a presentar valores seis veces mayores. Esta diferencia nos indica una mayor capacidad de las ostras cultivadas en cuerdas en la acumulación de los componentes orgánicos, los cuales servirán como reservorios energéticos para el metabolismo del animal, así como una baja capacidad de las ostras cultivadas en jaulas en la acumulación de componentes orgánicos, debido principalmente a la menor cantidad de alimento disponible libre dentro de las jaulas, como resultado de una mayor competencia por espacio y alimento y la formación del biofouling sobre las mallas externas de las jaulas.

Grant *et al.* (2003) comparando los sistemas de jaulas y el de colgado por oreja en el cultivo de *Placopecten magellanicus*, indica una superioridad significativa del sistema de colgado por oreja en el incremento del peso total, peso de las partes blandas y peso del músculo aductor. Mallet *et al.* (2013) cultivando *Crassostrea virginica* en jaulas flotantes y en cuerdas horizontales encuentran valores significativamente superiores del crecimiento en longitud y peso total en las ostras cultivadas en cuerdas. Estas comparaciones, son semejantes a la hecha en el presente capítulo, donde se comparan jaulas y ostras pegadas con cemento en cuerdas, validando los resultados relacionados a la mayor capacidad de obtención de materia orgánica en las ostras cultivadas en cuerdas frente a la mayor competencia intraespecífica en las ostras cultivadas en jaulas. Este fenómeno de competencia intraespecífica por espacio y alimento ya ha sido descrito por diversos autores estudiando moluscos bivalvos (Boromthanasri y Deslous-Paoli, 1988; Fréchette y Lefaivre, 1990; Marquet *et al.*, 1990; Parsons y Dadswell, 1992; Côté *et al.*, 1993; Fréchette y Lefaivre, 1995; Fréchette *et al.*, 1996; Alunno-Bruscia *et al.*, 2000; Cubillo *et al.*, 2012b). Sin embargo, estos estudios tienen como variable respuesta del efecto de la aglomeración, la supervivencia y el crecimiento. En el presente estudio las variables respuestas fueron la acumulación y movilización de los componentes bioquímicos principales.

Los valores de los componentes bioquímicos (proteínas, carbohidratos, glucógeno y lípidos) expresados en contenido total ($\text{mg}\cdot\text{ind}^{-1}$) fueron significativamente superiores ($P < 0,05$, ANOVA) en las ostras cultivadas en cuerdas en todos los muestreos. Esta superioridad indica que las ostras cultivadas bajo el sistema de jaulas presentan una menor eficiencia en la acumulación de las reservas bioquímicas. Esto puede ser explicado por las condiciones más favorables en el cultivo en cuerda, frente a una gran competencia por espacio y alimento presente en el cultivo de jaulas. El fenómeno de auto-raleo (self-thinning) descrito con más

detalles en el capítulo 7, es normalmente correlacionado a parámetros productivos como crecimiento y mortalidad (Westoby, 1984; Hughes y Griffiths, 1988; Fréchette y Lefaiivre, 1990; Pertraitis, 1995; Fuentes *et al.*, 2000; Cubillo, 2012), sin embargo, en este capítulo y en el capítulo anterior, podemos notar el efecto directo de la aglomeración sobre la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas y su consecuente transformación durante la gametogénesis.

La acumulación, en contenido total, de los componentes bioquímicos principales en las ostras cultivadas en jaulas tiene una evolución semejante al índice de condición, con valores que se incrementan, en el primer año, hasta el muestreo de junio y en el segundo año hasta el muestreo de agosto. Esta sincronía del acumulo de los componentes bioquímicos con el índice de condición ya había sido descrita por otros autores (Ruiz *et al.*, 1992a; Parra *et al.*, 2005; Dridi *et al.*, 2007). Sin embargo, este incremento de los componentes bioquímicos paralelo al índice de condición, no resultaron en la maduración de todas las ostras cultivadas en jaulas, una vez que solo los machos llegaron a la maduración total (IIIA) y la consecuente puesta.

La ausencia de puesta en las hembras cultivadas en jaulas se debe a la mayor necesidad energética de las hembras para la síntesis y maduración de los ovocitos, la cual no fue alcanzada en los dos primeros ciclos gonadales de *C.gigas* cultivada en jaulas bajo una densidad de 100 ostras/cesta, contrastando con los resultados obtenidos en el capítulo 3, donde se siguió el desarrollo gonadal de ostras cultivadas en jaulas bajo una densidad de 40 ostras/cesta en el segundo y tercer ciclo gonadal habiendo maduración y puesta en ambos años de estudio. Con base a estos resultados, se puede observar el efecto directo de la aglomeración en el acumulo y movilización de las reservas bioquímicas y la consecuente formación y maduración de los gametos, con especial énfasis en los ovocitos. Estos resultados demuestran el efecto del auto-raleo en la bioquímica y biología reproductiva de *C.gigas* cultivada en jaulas.

Las ostras cultivadas en cuerdas presentan una evolución de los componentes bioquímicos, en el primer año, distinta a la encontrada en la literatura. Normalmente, *C. gigas* cultivada en Europa, presenta un periodo de acumulo de carbohidratos (glucógeno) previo a la maduración gonadal, un periodo de quiebra del glucógeno y biosíntesis de los lípidos durante la vitelogénesis en primavera y un periodo de puesta en verano con bajada significativa de los valores de los lípidos (Mann, 1979; Ruiz *et al.*, 1992a; Berthelin *et al.*, 2000). Las ostras cultivadas en cuerdas incrementan todos sus componentes bioquímicos durante el verano alcanzando sus valores máximos en finales de verano y principios de otoño, aprovechando el incremento de los valores de clorofila *a* registrados entre septiembre y octubre. Esta evolución de las ostras cultivadas en cuerdas, demuestra que las mismas tenían energía suficiente para producir y madurar los gametos, así como mantener el acúmulo de las reservas bioquímicas.

Con relación al porcentaje de los componentes bioquímicos principales dentro de la materia orgánica (%MO), hemos verificado diferencias significativas entre los sistemas de cultivo estudiados. Las ostras cultivadas en jaulas tuvieron las proteínas como la principal reserva energética, presentando valores que fueron del 42,6 hasta el 59%, mientras que las ostras cultivadas en cuerdas presentaron como componentes mayoritarios de la MO los carbohidratos y las proteínas, no habiendo diferencias significativas entre los dos componentes.

Los valores del porcentaje de proteínas en la MO fueron significativamente superiores en el sistema de jaulas ($P < 0,05$, ANOVA). Esta superioridad, del cultivo en jaulas frente al cultivo en cuerdas, indica que las proteínas tienen una mayor importancia frente a los otros componentes en situaciones de estrés nutricional y balance energético negativo. Gabbott y Bayne (1973) y Liu *et al.* (2008) estudiando mitílidos y venéridos respectivamente, ya habían descrito esta tendencia de acúmulo de proteínas en situaciones adversas.

Los lípidos fueron el tercer componente en porcentaje de la MO en ambos sistemas de cultivo, siendo significativamente superiores en el sistema de cuerdas ($P < 0,05$, ANOVA). Sin embargo, cuando se evalúa el efecto de los meses sobre la acumulación de los lípidos, el sistema de cuerdas presenta superioridad significativa solamente en los muestreos de agosto hasta octubre de 2008 y marzo hasta mayo de 2009. Estos valores elevados del porcentaje de lípidos durante el periodo de otoño del primer año y primavera del segundo año, reflejan los procesos de acumulación de lípidos, que se dan antes de la puesta (Beninger y Lucas, 1984; Soudant *et al.*, 1998; Berthelin *et al.*, 2000; Fernández-Reiriz *et al.*, 2007) y después de la misma (Albentosa *et al.*, 2007; Joaquim *et al.*, 2008; Joaquim *et al.*, 2011).

Los lípidos son considerados la fuente de energía más eficiente (Pogoda *et al.*, 2013), sin embargo, en ostras, el glucógeno es la reserva energética más preferida, una vez que su catabolismo proporciona energía instantánea rápidamente y se puede realizar bajo condiciones anóxicas e hipóxicas, factores importantes cuando las ostras permanecen con las valvas cerradas por largos periodos (Hummel *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1999).

Deslous-Paoli y Heral *et al.* (1988) evaluando la composición bioquímica de *C. gigas* en Francia, observan que valores cercanos al 1% de glucógeno en la materia orgánica, representan señales de sobrepoblación. Estos valores no fueron encontrados en el presente capítulo, sin embargo, las ostras cultivadas en jaulas presentaron porcentajes significativamente inferiores ($P < 0,05$, ANOVA) a las encontradas en las ostras cultivadas en cuerdas. Estos bajos valores de glucógeno, no pueden ser relacionados con la disponibilidad del alimento en el medio, una vez que las ostras estaban siendo cultivadas en la misma batea, pero deben tener una relación directa con la disponibilidad real de alimento de cada ostra, lo que tiene que ver con la competencia intraespecífica dentro de las jaulas y con el impacto negativo del biofouling, que afectan directamente a la acumulación de las reservas bioquímicas.

Varios estudios comprueban el efecto negativo del biofouling sobre el crecimiento de ostras y vieiras cuando cultivadas en jaulas (Wallace y Reisnes, 1985; Claereboudt *et al.*, 1994; Mouland y Parsons, 1999; Milione and Southgate, 2011) y apuntan que las mallas de las jaulas disminuyen el flujo de agua.

6.5. CONCLUSIONES

- El sistema de cultivo afecta a la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas.
- Las ostras cultivadas bajo el sistema de jaulas presentan una menor eficiencia en la acumulación de las reservas bioquímicas.
- Hay un efecto directo de la aglomeración sobre la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas y su consecuente transformación durante la gametogénesis, con énfasis en la ovogénesis.
- La competencia intraespecífica dentro de las jaulas y la formación del biofouling sobre las mallas externas son las principales causas para la menor eficiencia en la acumulación de las reservas bioquímicas en jaulas.
- El sistema de cuerdas proporciona un mayor acumulo de materia orgánica y de todos los componentes bioquímicos principales.
- Ostras cultivadas en cuerdas presentan energía suficiente para producir y madurar los gametos, así como mantener el acúmulo de las reservas bioquímicas.
- Ostras cultivadas en jaulas acumulan proteínas como componente mayoritario de la materia orgánica, mientras ostras cultivadas en cuerdas acumulan tanto carbohidratos como proteínas.
- El mayor porcentaje de proteínas en jaulas indica una mayor importancia de este componente frente a los demás en situaciones de estrés nutricional y balance energético negativo.

**7. EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Crassostrea gigas* CULTIVADA EN BATEA**

EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Crassostrea gigas* CULTIVADA EN BATEA

7.1. INTRODUCCIÓN

La ostricultura presentó en el año de 2010 una producción de aproximadamente 4,5 millones de toneladas lo que representa el 5,8% de la producción acuícola mundial. Entre las especies de ostras cultivadas en el mundo, podemos destacar la ostra japonesa *Crassostrea gigas* la cual presentó una producción de 4,3 millones de toneladas en el año de 2010 (FAO, 2013a).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) presenta registros de producción de la ostra japonesa en España desde 1964, sin embargo no fue hasta 1991 cuando se autorizaron las primeras pruebas de cultivo de *C. gigas* en 16 bateas de las Rías gallegas con el fin de valorar la viabilidad de esta especie desde un punto de vista productivo y ecológico (Xunta de Galicia, 1992). Desde entonces y hasta el presente, los productores han continuado su actividad en el marco de estas autorizaciones. Su explotación en Galicia desde 1991 supuso un gran avance en el sector ostrícola, por su mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana, *Ostrea edulis*, de cultivo tradicional y autóctona de esta zona (Fernández *et al.*, 2002). Pero aún existe una gran necesidad de estudios más profundos acerca del cultivo de *C. gigas* para las condiciones ambientales en las zonas de cultivo de las costas gallegas.

Galicia presenta una peculiaridad en el cultivo de moluscos en Europa, donde se utilizan bateas de madera para el cultivo en suspensión de mejillones, ostras y vieiras. Las experiencias de producción de la ostra plana *Ostrea edulis* en bateas de las Rías gallegas apuntan dos sistemas de cultivo principales, uno con la utilización de cestas ostrícolas plásticas y el otro con cuerdas donde las ostras son pegadas con cemento (Pérez Camacho y Román, 1985). Este sistema de cultivo, viene siendo utilizado en Galicia desde 1967, cuando Andreu desarrolla esta técnica de engorde (Pardellas y Polanco, 1987).

Un cultivo de ostras exitoso depende en gran medida de la adaptación de las prácticas de manejo a las características locales. En otras palabras, la metodología específica utilizada para una determinada especie en un lugar determinado puede promover mejores resultados y aumentar la productividad (Maccachero *et al.*, 2007). La introducción de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* en Galicia demanda una serie de estudios para poner a punto una tecnología de cultivo de esta especie especialmente adaptada a las condiciones presentes en las Rías gallegas.

La elección del sistema de cultivo a utilizar es una importante cuestión que debe ser discutida antes de iniciar cualquier inversión. En Galicia son escasos los trabajos que evalúan el cultivo de *Crassostrea gigas*. Los sistemas utilizados para el cultivo de *C. gigas* en las Rías gallegas fueron el de cestas ostrícolas plásticas y el de pegado en cuerdas, utilizados en las Rías de Arousa y Vigo y el de cultivo intermareal empleando sacos ostrícolas comerciales (poches) en la Ría de Ribadeo (Guerra *et al.*, 1987; Guerra *et al.*, 1995; Iglesias *et al.*, 2005). Sin embargo, estos trabajos no llegan a conclusiones que permitan determinar el mejor sistema de cultivo para las condiciones presentes en las Rías gallegas.

El presente capítulo tiene como objetivo analizar el efecto de los sistemas de cultivo en jaulas y cuerdas en el crecimiento, tiempo de cultivo y supervivencia de *C. gigas* cultivada en batea en la Ría de Arousa, determinándose el mejor sistema de cultivo con relación a la cantidad y calidad producida.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1. Área de cultivo y muestreo

Las semillas de ostras fueron traídas de la Bahía de Arcachon (Francia) en el mes de marzo de 2008 y permanecieron en aclimatación en la batea durante tres semanas antes del comienzo del cultivo. La batea utilizada posee las dimensiones estándar (22 x 25 m) y está ubicada en la Ría de Arousa, en el Polígono A7 de O Grove.

Las ostras fueron mantenidas en dos sistemas de cultivo, uno denominado jaula, patentado por el IEO, y el otro cuerda. Las jaulas son estructuras cilíndricas compuestas por bandejas plásticas circulares envueltas por una malla externa. Se utilizaron en cada jaula 6 bandejas (con un diámetro de 0,36 m, altura de 0,15 m y una superficie de 0,1 m²) recubiertas por una malla de 10 mm. La densidad utilizada en el sistema de jaula fue de 100 ostras/bandeja, lo que supone un número de 1000 ostras por metro cuadrado. La cuerda es un sistema tradicional utilizado para el cultivo de la ostra plana *Ostrea edulis*, que consiste en pegar las ostras a las cuerdas con cemento, en grupos de 4, con una distancia media de 15-20 cm entre grupos. La cuerdas tenían una longitud de aproximadamente 6 metros, totalizando 150 ostras por cuerda.

Para el cultivo en jaula se realizaron tres replicas y para el cultivo en cuerdas se utilizaron 10 replicas.

Los valores iniciales de peso total, longitud y anchura de las ostras fueron de $5,31 \pm 0,89$ g, $37,95 \pm 6,02$ mm y $23,66 \pm 2,03$ mm, respectivamente.

En el sistema de jaulas se cambiaron las mallas externas por mallas nuevas de iguales características en el mes de junio de 2008, pasados dos meses de cultivo. Las cuerdas permanecieron sin cambios hasta el final del cultivo.

Los muestreos fueron realizados durante el periodo de 16/04/2008 hasta 19/05/2009. En cada muestreo se evaluó una bandeja de cada jaula y una cuerda, obteniéndose los datos de longitud, anchura, altura y peso total de 40 ostras, con la utilización de un calibre con una precisión de 0,1 mm para los datos morfométricos y una balanza con una precisión de 0,001 g, para el peso. Para la determinación de la supervivencia, en cada muestreo, se anotó el número de individuos muertos. En el caso de las jaulas, las valvas de los ejemplares muertos se mantuvieron en las estructuras de cultivo para no alterar la densidad.

Con los datos de peso total y supervivencia, se ha podido calcular la producción por unidad de cultivo, siendo este parámetro determinado como el número de individuos vivos multiplicado por el peso unitario en cada muestreo.

7.2.2. Peso húmedo y peso seco de las partes blandas

En cada muestreo, 10 ostras de cada tratamiento fueron llevadas al Centro Oceanográfico de A Coruña del IEO para la determinación del peso húmedo y peso seco de las partes blandas. Para ello, las ostras fueron abiertas y obtenidos los datos de peso húmedo de las partes blandas utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Posteriormente se obtuvo el peso seco de las partes blandas mediante la liofilización de la carne durante 48 h en un liofilizador.

7.2.3. Presencia de cámaras de gel

Para evaluar la calidad de las ostras en cuanto a su aspecto, se analizó la presencia de cámaras de gel, dato que permite determinar el grado de malformaciones de la concha. Estas cámaras presentan habitualmente en su interior una sustancia de naturaleza proteínica, con consistencia de gel, que confiere a las ostras un aspecto desagradable y si son perforadas pueden desprender mal olor (Iglesias *et al.*, 2005).

Para la determinación de este índice se examinaron mensualmente las valvas de 40 ostras y se calcularon los siguientes índices A y B de afectación por cámaras de gel propuestos por Alzieu *et al.* (1986): A: porcentaje de afectación de una de las valvas, normalmente la valva derecha y B: porcentaje de afectación de ambas valvas simultáneamente.

7.2.4. Índices de forma (IF)

Se han calculado los índices de forma descritos por Brake *et al.* (2003), que emplean las relaciones:

$$IF1 = \text{anchura/longitud}$$

$$IF2 = \text{altura/longitud}$$

Estos índices permiten separar las ostras que presentan valores superiores al umbral de 0,63 para el IF1 y 0,25 para el IF2, a partir de los cuales la forma de las ostras sería adecuada para el mercado.

7.2.5. Variables ambientales

Los datos de temperatura y salinidad en la columna de agua a una profundidad de 0-5 metros, fueron obtenidos con una sonda CTD Sea-Bird 25. Los datos de clorofila *a* fueron obtenidos por el filtrado a presión constante de un volumen de 100 mL de agua a una profundidad de 0-5 metros, separando las partículas en dos clases $>2,7\mu\text{m}$ y $<2,7\mu\text{m}$, las cuales

fueron sumadas para representar el dato de clorofila *a*. La extracción de la clorofila *a* presente en los filtros de fibra de vidrio se realiza con acetona al 90% refrigerada y en oscuridad por no menos que 14 horas. Posteriormente se analizan por espectrofotometría por medio de una ecuación tricromática, siguiendo el método de Neveux y Panouse (1987). Todos los datos fueron obtenidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia, en una estación meteorológica ubicada cercana a la batea de cultivo en el polígono A7 de O Grove. Estos datos fueron proporcionados por el INTECMAR en el marco del convenio entre éste organismo y el IEO para la toma de datos oceanográficos en las Rías Gallegas.

7.2.6. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Plus 5.1. Para todos los datos se analizó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, cuando presentaban el mismo número de datos y de Bartlett cuando presentaban un número distinto. Cuando los datos son normales y las varianzas homogéneas se realizó el test *t* de Student y en los casos en que los datos no se adecuaron a la distribución normal o las varianzas no fueron homogéneas se utilizó el test de Mann-Whitney. Para evaluar el efecto conjunto del sistema de cultivo y del tiempo sobre los datos de crecimiento en longitud, anchura, peso total, peso fresco carne y peso seco carne se utilizó el ANOVA de dos vías para los datos normales seguido del test de Student-Newman-Keuls para la separación de las medias y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis de dos vías seguido del test de Mann-Whitney para la separación de las medianas. En todos los casos se utilizó un α de 5%.

Con los datos de supervivencia se utilizó la transformación arcoseno.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Crecimiento en longitud y anchura

La significancia en la interacción sistema:mes en los datos de longitud y anchura (Tabla 7.1) demuestran una evolución temporal distinta entre los dos sistemas de cultivo evaluados (Figuras 7.1 y 7.2). Durante los primeros cuatro meses, las ostras cultivadas en jaulas presentaron valores de longitud significativamente superiores ($P < 0,05$, Mann-Whitney) a las ostras cultivadas en cuerdas. Entre los meses de septiembre y octubre, las ostras en cuerda presentaron un crecimiento significativo ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) mientras las ostras cultivadas en jaulas mantuvieron sus valores, no habiendo diferencia significativa ($P > 0,05$, Mann-Whitney) entre los valores medios de longitud. En el mes de octubre las ostras cultivadas en jaula bajo una densidad de 100 ostras/bandeja alcanzan su valor máximo de longitud, con $85,83 \pm 19,99$ mm (Figura 7.1).

Tabla 7.1. Resultados obtenidos del ANOVA de dos vías testando el efecto del sistema de cultivo y del periodo de muestreo sobre los valores medios de longitud (mm), anchura (mm), peso total (g), peso fresco de la carne (g) y peso seco de la carne (g) de ostras cultivadas en batea en la Ría de Arousa.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Longitud				
Sistema	1	3538,90	3538,90	381,46***
Mes	8	2022,11	252,76	27,25***
Sistema:mes	8	1905,62	238,20	25,68***
Error	158	1465,80	9,28	
Anchura				
Sistema	1	51587	51587	578,65***
Mes	8	25513	3189	35,77***
Sistema:mes	8	16682	2085	23,39***
Error	1206	107515	89	
Peso total				
Sistema	1	28274,4	28274,4	89,24***
Mes	8	158023,2	19752,9	62,35***
Sistema:mes	8	33713,9	4214,2	13,30***
Error	363	115006,8	316,8	
Peso fresco carne				
Sistema	1	3538,90	3538,90	381,46***
Mes	8	2022,11	252,76	27,25***
Sistema:mes	8	1905,62	238,20	25,68***
Error	158	1465,80	9,28	
Peso seco carne				
Sistema	1	255,9785	255,9785	570,58***
Mes	8	105,8777	13,2347	29,50***
Sistema:mes	8	99,0483	12,3810	27,60***
Error	158	70,8831	0,4486	

(*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Desde el mes de diciembre hasta el final del cultivo las ostras cultivadas en cuerda incrementan significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) sus valores de longitud, mientras las ostras cultivadas en jaulas presentan una disminución significativa ($P < 0,05$, Kruskal Wallis, Mann-Whitney) de sus valores medios. Esta diferencia en la evolución del crecimiento en longitud llevó a que, al final de la experiencia, las ostras cultivadas en cuerdas fueran significativamente mayores que las cultivadas en jaulas ($P < 0,05$, Mann-Whitney).

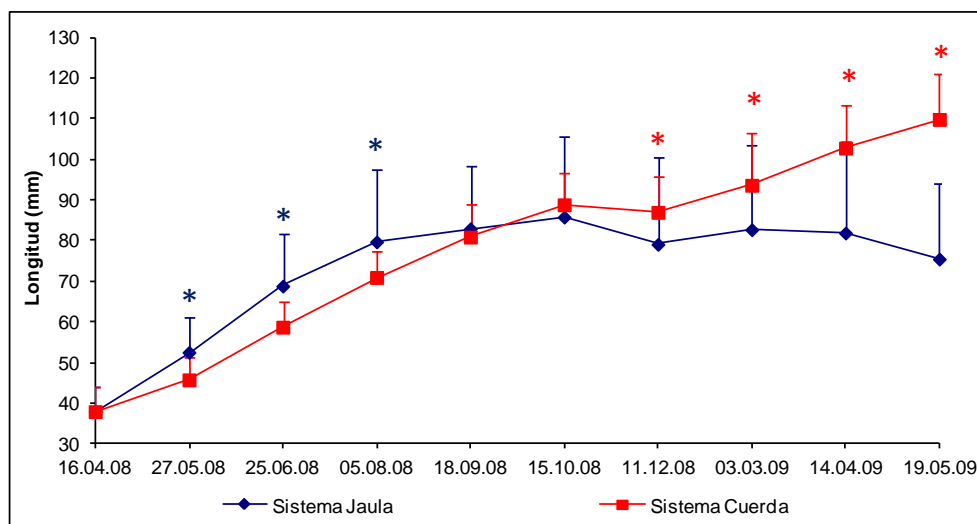


Figura 7.1. Evolución de la longitud (mm) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Mann-Whitney).

La figura 7.2 presenta la evolución de los datos de anchura durante el cultivo. En el primer mes, las ostras cultivadas en ambos los sistemas no difirieron significativamente ($P > 0,05$, Test *t* de Student) en sus valores de anchura. A partir del mes de junio de 2008 y hasta el final del cultivo (mayo de 2009), las ostras cultivadas en cuerda presentaron valores significativamente superiores ($P < 0,05$, Mann-Whitney) a las ostras cultivadas en jaulas. Los valores máximos de anchura fueron observados en el mes de octubre de 2008 ($51,76 \pm 9,16$ mm) para las ostras cultivadas en el sistema de jaulas y en el mes de mayo de 2009 ($77,38 \pm 6,03$ mm) para las ostras cultivadas en cuerdas.

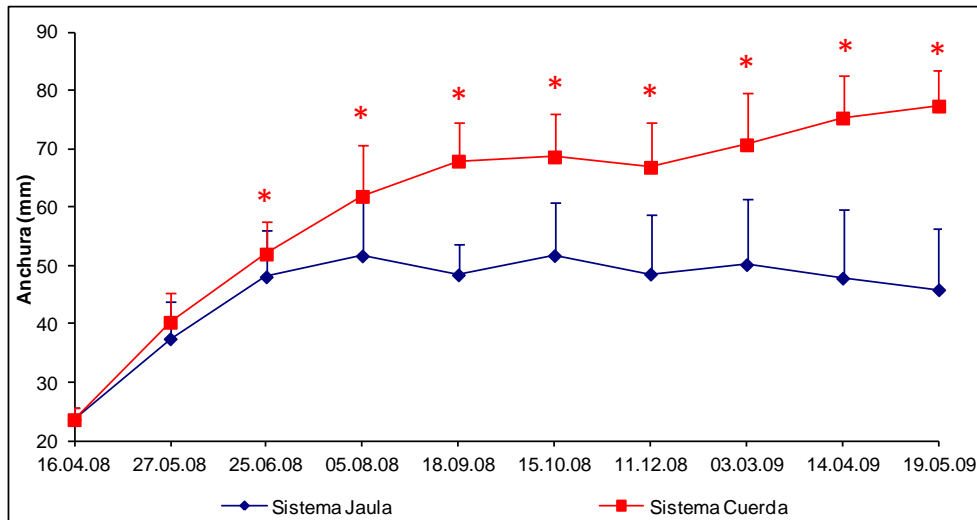


Figura 7.2. Evolución de la anchura (mm) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Mann-Whitney).

7.3.2. Índices de forma (IF)

Los datos del índice de forma 1, que relaciona anchura y longitud, fueron significativamente superiores ($P < 0,05$, Test t de Student) durante todo el cultivo en el sistema de cuerda, presentando siempre valores medios superiores al umbral de 0,63, descrito por Brake *et al.* (2003) como el valor mínimo a partir del cual la forma de las ostras sería adecuada para el mercado. Por otro lado, las ostras cultivadas en jaulas, presentaron valores superiores al umbral solamente en los dos primeros muestreos y valores iguales en los muestreos de agosto y octubre (Figura 7.3).

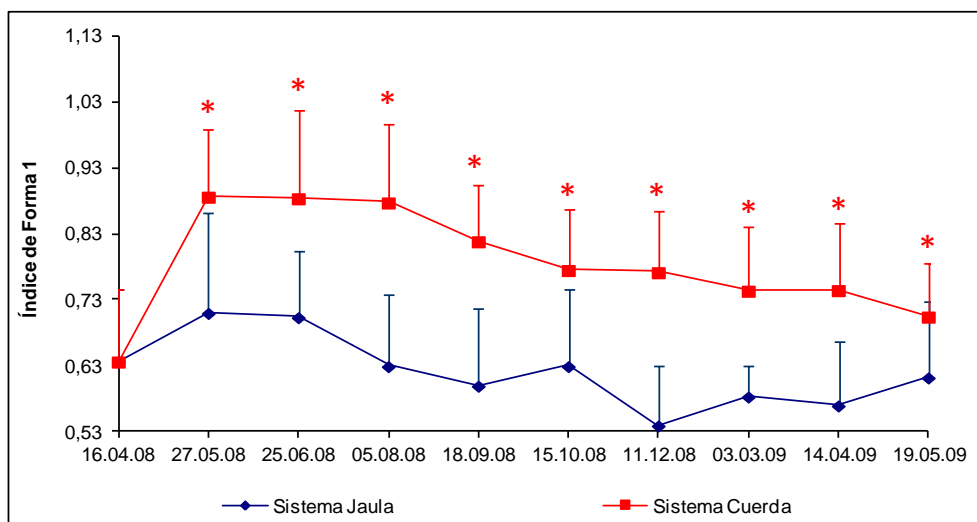


Figura 7.3. Evolución del Índice de forma 1 en *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Mann-Whitney).

El índice de forma 2, que relaciona la altura con la longitud, fue superior al umbral de 0,25 descrito por Brake *et al.* (2003), en los dos sistemas evaluados durante todo el cultivo. Cuando se comparan los valores del índice de forma 2 obtenidos en los dos sistemas de cultivo, se ha podido observar una superioridad significativa ($P < 0,05$, Test *t* de Student) del sistema de cuerda en los meses de junio, agosto y diciembre (Figura 7.4).

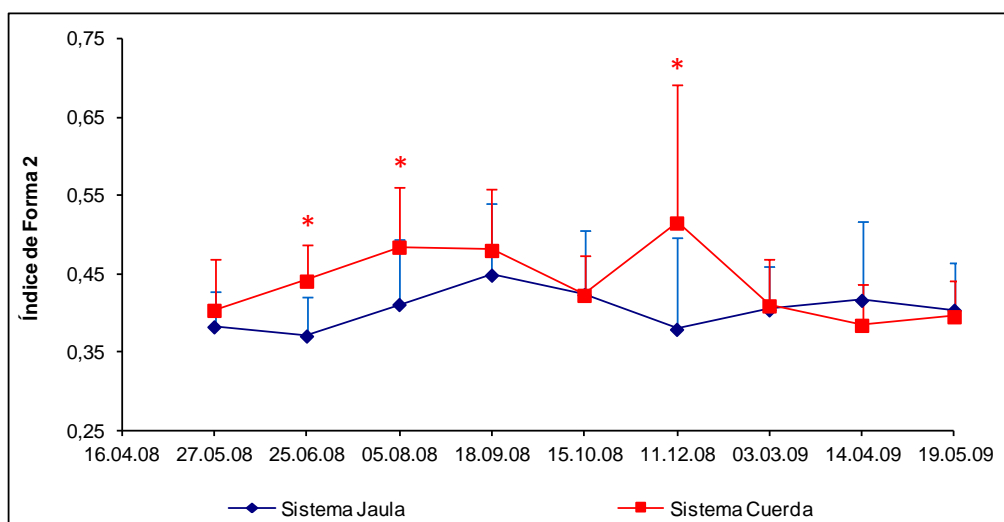


Figura 7.4. Evolución del Índice de forma 2 en *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Test *t* de Student).

7.3.3. Peso total, Peso húmedo y peso seco de las partes blandas

Los datos de peso total, peso húmedo y peso seco de las partes blandas presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA de dos vías; Tabla 7.1) en relación a los sistemas de cultivo, tiempo de muestreo y en la interacción sistema:mes, lo que denota una influencia de los sistemas empleados como también de los periodos de muestreo en la evolución de los parámetros estudiados.

Con relación al peso total, las ostras cultivadas en el sistema de jaula presentaron valores medios superiores en los tres primeros muestreos del cultivo, siendo diferentes significativamente ($P < 0,05$, Mann-Whitney) solamente en el mes de junio. Pasado este periodo de rápido crecimiento, las ostras cultivadas en jaulas presentan una desaceleración del crecimiento e incluso una disminución significativa ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney) al fin del periodo de estudio. Por otro lado, las ostras cultivadas en cuerdas presentan crecimiento rápido durante el verano, pasado por un periodo de estancamiento durante el invierno y retomada del crecimiento en la primavera del segundo año de estudio (Figura 7.5).

Estas diferencias de crecimiento en peso llevaron a que las ostras cultivadas en cuerda presentasen valores significativamente superiores ($P < 0,05$, Test t de Student) desde el mes de septiembre hasta el final del cultivo.

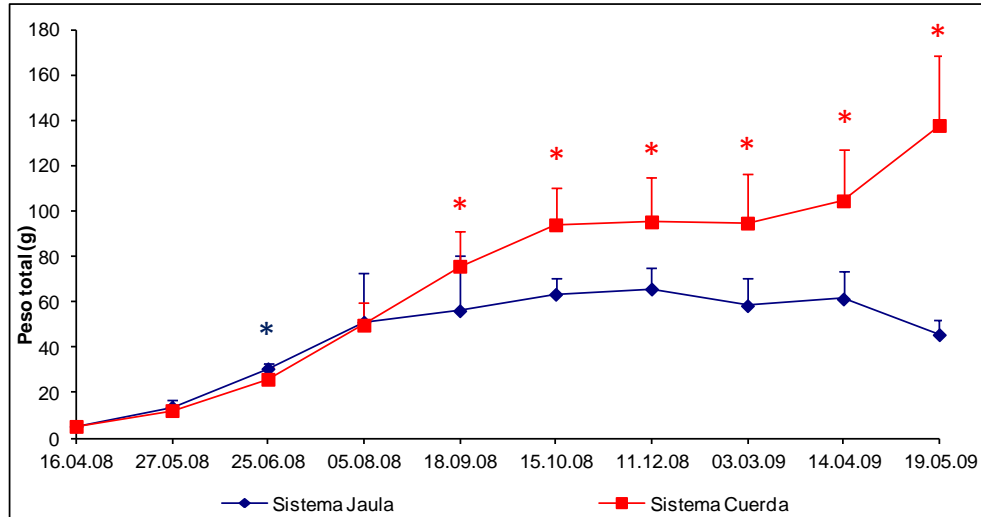


Figura 7.5. Evolución del peso total (g) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Test t de Student).

La evolución del peso húmedo y del peso seco de las partes blandas puede ser observada en las figuras 7.6 y 7.7, respectivamente. Durante todo el cultivo, las ostras mantenidas en el sistema de cuerdas presentaron valores de peso húmedo y peso seco de las partes blandas significativamente superiores ($P < 0,05$, Test t de Student) a las ostras cultivadas en jaulas.

Las ostras cultivadas en cuerdas incrementaron significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) sus valores de peso húmedo y peso seco de las partes blandas hasta el muestreo de octubre con valores de $19,46 \pm 3,07$ g y $4,29 \pm 0,65$ g, respectivamente. Pasado por este periodo ocurre una reducción significativa ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) de ambos valores en invierno y una retomada del crecimiento en primavera, finalizando el cultivo con los máximos valores observados de peso húmedo ($24,98 \pm 3,82$ g) y peso seco de las partes blandas ($5,85 \pm 0,93$ g).

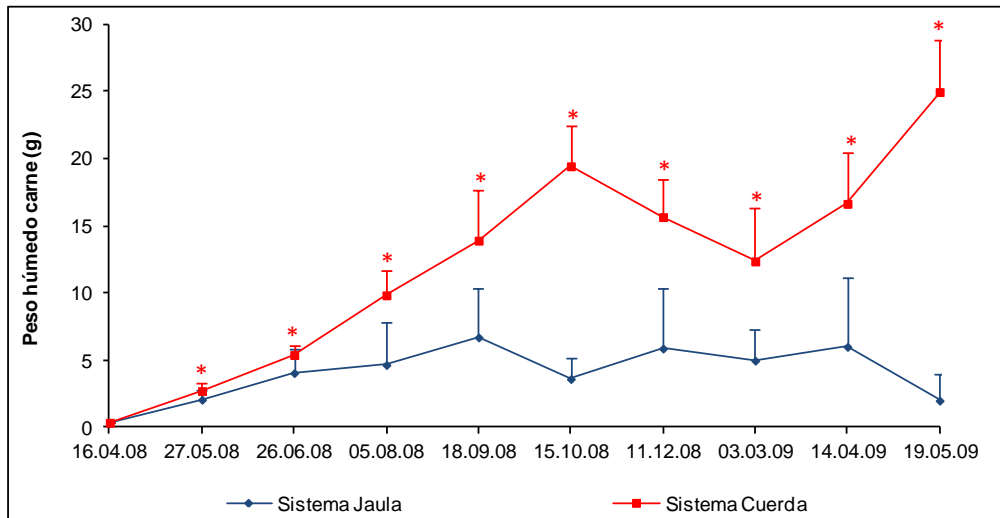


Figura 7.6. Evolución del peso húmedo de las partes blandas (g) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato médio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Test t de Student).

Las ostras cultivadas en jaulas presentaron un incremento continuo pero no significativo ($P > 0,05$, ANOVA, SNK) de ambos los pesos evaluados hasta el muestreo de septiembre, donde alcanzan el valor máximo ($6,71 \pm 3,61$ g) para el peso húmedo de las partes blandas. Con relación al peso seco de las partes blandas, este ha tenido su valor más elevado en el muestreo de diciembre con $1,14 \pm 1,10$ g.

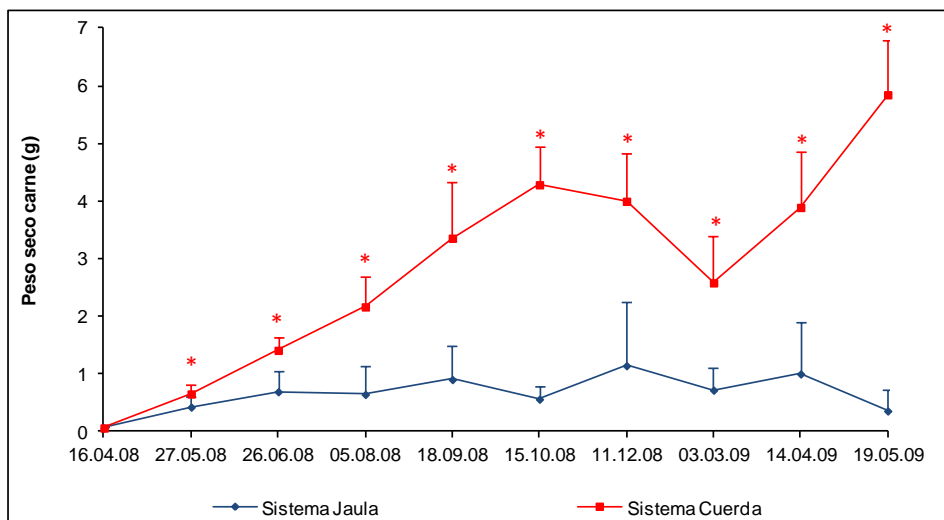


Figura 7.7. Evolución del peso seco de las partes blandas (g) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato médio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Test t de Student).

7.3.4. Supervivencia

La supervivencia se mantuvo elevada en los dos sistemas de cultivo en los seis primeros meses, con valores medios superiores al 94% (Figura 7.8). Pasado este periodo, las ostras cultivadas en jaulas empiezan a presentar un fuerte descenso de la supervivencia llegando al final del cultivo a valores medios del $45,5 \pm 12,4\%$. En cambio, las ostras cultivadas en cuerdas presentaron valores elevados de supervivencia durante todo el periodo de estudio, llegando al final del cultivo con valores superiores al 92%.

Los valores de supervivencia difieren significativamente ($P < 0,05$, Test t de Student) en los tres últimos muestreos con valores superiores en el sistema de cuerda.

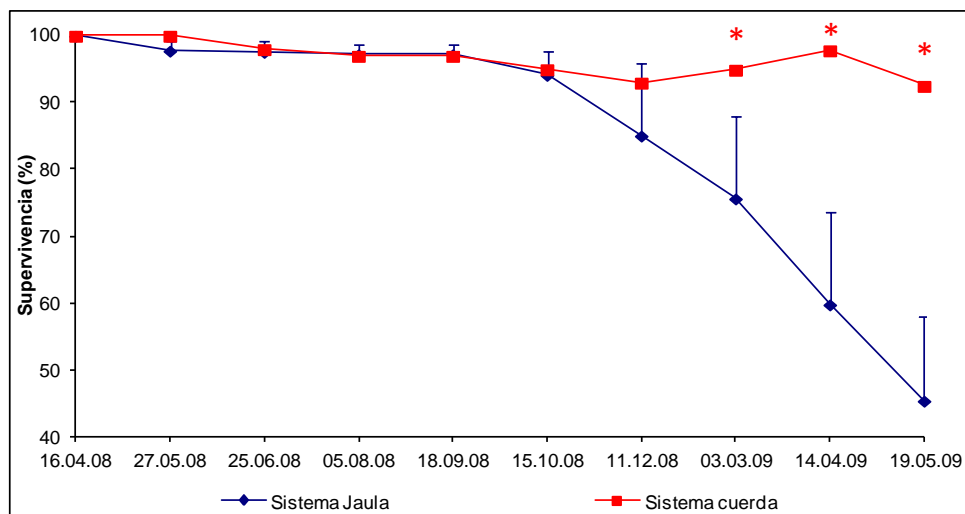


Figura 7.8. Evolución de la Supervivencia (%) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de). Los asteriscos indican diferencia significativa entre sistemas de cultivo ($P < 0,05$, Test t de Student).

7.3.5. Producción por unidad de cultivo

Los valores de producción por unidad de cultivo no fueron comparados estadísticamente, una vez que presentaban diferencia significativa ($P > 0,05$, Test t de Student) al empezar el cultivo.

La evolución de la producción por unidad de cultivo puede ser observada en la figura 7.9. El sistema de jaula presenta un crecimiento de la producción hasta el muestreo de octubre donde alcanza el valor máximo de $33,0 \pm 2,9$ kg por unidad de cultivo, manteniéndose elevado hasta diciembre con un valor promedio de $32,6 \pm 7,8$ kg. A continuación, los valores de producción disminuyen, llegando al final del cultivo con valores de $11,5 \pm 3,7$ kg por unidad de cultivo. Por otra parte, la evolución de la producción por unidad de cultivo en el sistema de

cuerda muestra un crecimiento continuo hasta el final del cultivo, llegando a valores finales de $18,7 \pm 4,2$ kg por unidad de cultivo.

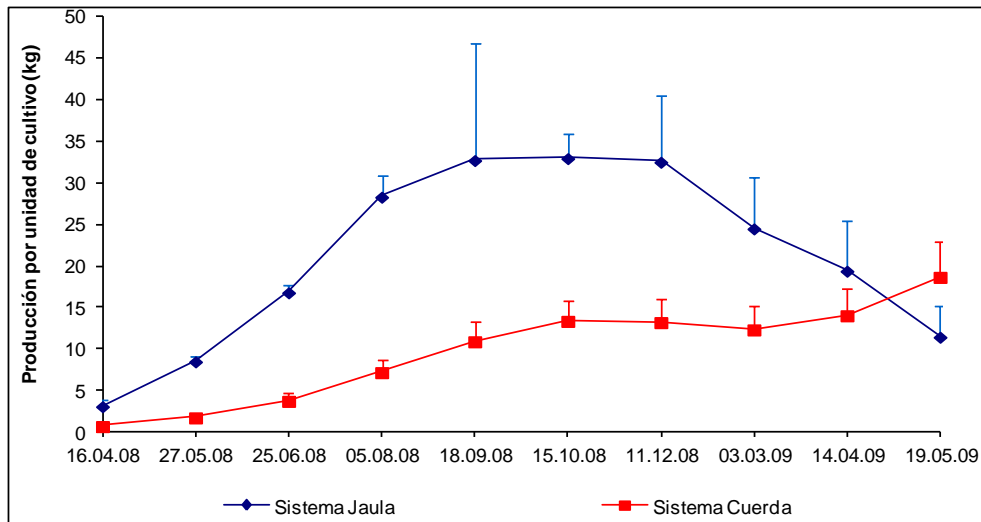


Figura 7.9. Evolución de la producción por unidad de cultivo (g) de *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de).

7.3.6. Presencia de cámaras de gel

Durante todo el cultivo no fueron observadas ostras con afectación por cámaras de gel en ambas valvas (índice B), siendo utilizado solamente el índice A (afectación de una de las valvas) para la determinación del porcentaje de individuos con presencia de cámaras de gel.

Las ostras cultivadas en jaulas presentaron un incremento del porcentaje de afectación por cámaras de gel a partir del verano, llegando a registrar sus valores máximos en octubre con 80% de las ostras afectadas por cámaras de gel en la valva superior. Pasado este pico de afectación ocurre una rápida disminución durante el invierno, seguido de un incremento en primavera (Figura 7.10).

Las ostras cultivadas en cuerdas presentaron durante todo el periodo de estudio valores máximos del 5% de afectación por cámaras de gel, salvo en los meses de septiembre de 2008 y marzo de 2009, en los que alcanzaron el 20% (Figura 7.10). Durante el momento de mayor venta del año (diciembre) las ostras cultivadas en cuerdas no presentaron afectación por cámaras de gel.

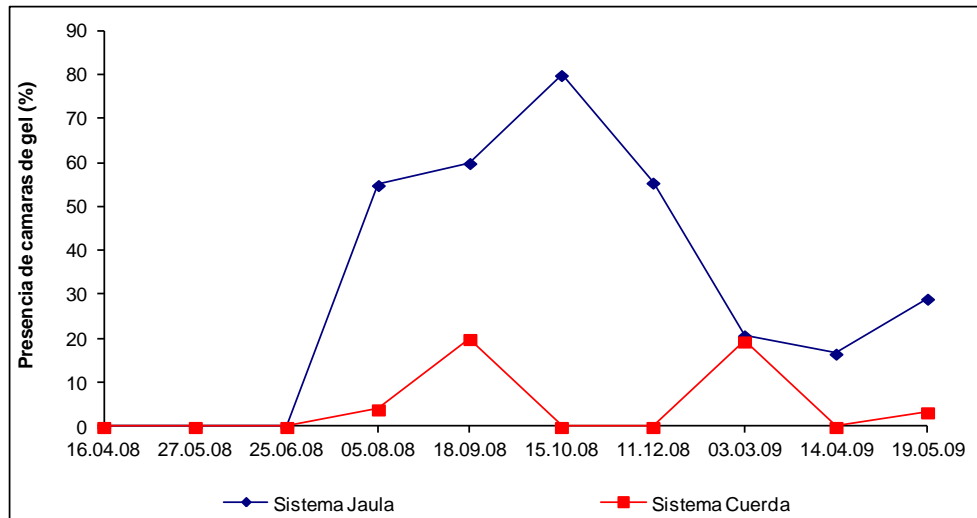


Figura 7.10. Evolución del Índice A de afectación por cámaras de gel (%) en *Crassostrea gigas* cultivada en los sistemas de jaula y cuerda en la Ría de Arousa (dato medio + de).

7.3.7. Variables ambientales

La figura 7.11 presenta la evolución de los datos de temperatura, salinidad y clorofila *a* durante el periodo de estudio. La salinidad ha sido muy constante durante todo el periodo de cultivo, presentando un valor medio de $34,51 \pm 1,35\text{‰}$ (Figura 7.11a). Los valores más bajos de salinidad fueron observados en el invierno de 2009 con el valor mínimo de $28,75\text{‰}$.

La temperatura presentó un ciclo estacional bastante marcado, con la elevación de los valores durante la primavera, las temperaturas más elevadas durante el verano, la disminución gradual durante el otoño y las temperaturas más bajas durante el invierno. La Ría de Arousa, más específicamente el Polígono A7 de O Grove, zona donde fue realizado el cultivo, presenta una moderada variación térmica con valores mínimos no inferiores a los 11°C y máximos que no alcanzan los 19°C durante todo el año.

La producción primaria fue evaluada por la medición del pigmento fotosintético clorofila *a*, el cual presentó en el año de 2008 dos picos de máxima producción, uno en primavera (28/04) con $3,42 \mu\text{g/l}$ y el otro en otoño (22/09) con $3,10 \mu\text{g/l}$ (figura 7.11b). En el año de 2009, la evolución de la clorofila *a* fue distinta al año anterior, presentando valores elevados en finales de invierno, con $1,93 \mu\text{g/l}$ en 16/03 y durante toda la primavera.



Figura 7.11. Evolución de la temperatura (a), salinidad (a) y clorofila a (b) en el Polígono A7 de O Grove, Ría de Arousa durante el período de estudio.

7.4. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó el efecto de dos sistemas de cultivo sobre los parámetros de crecimiento y de calidad de la ostra japonesa cultivada en batea en la Ría de Arousa y verificó diferencias significativas entre los dos sistemas utilizados. Con relación al crecimiento en longitud, durante los primeros meses de cultivo, el sistema de jaulas presenta superioridad significativa, sin embargo el efecto negativo de la aglomeración realizada en el cultivo de jaulas bajo una densidad de 100 ostras/bandeja empieza a reducir el crecimiento a partir del mes de septiembre pasados 5 meses de cultivo. El mismo efecto de ralentización del crecimiento fue observado para los datos de anchura y peso total en las ostras cultivadas en jaulas. Este efecto de disminución del crecimiento puede estar explicado por el incremento de la competencia intraespecífica por espacio y alimento descrita por diversos autores (Boromthanasri y Deslous-Paoli, 1988; Fréchette y Lefaivre, 1990; Marquet *et al.*, 1990; Parsons y Dadswell, 1992; Côté *et al.*, 1993; Fréchette y Lefaivre, 1995; Fréchette *et al.*, 1996; Alunno-Bruscia *et al.*, 2000; Cubillo *et al.*, 2012b).

El cultivo en cuerda ha presentado mejor resultado en crecimiento en anchura; ello puede estar relacionado con la mayor disponibilidad de espacio para el crecimiento natural de esta especie. Utilizando el índice de forma 1, lo cual relaciona la anchura con la longitud, descrito por Brake *et al.* (2003), se ha podido verificar esta tendencia, ya que las ostras cultivadas en cuerda presentaron un índice significativamente superior al del cultivo en jaulas durante todos los muestreos.

Con relación al crecimiento en peso húmedo y seco de las partes blandas, los datos demuestran una superioridad significativa del cultivo en cuerda durante todo el periodo de estudio.

La disminución de los parámetros de crecimiento en las ostras cultivadas en jaulas bajo la densidad de 100 ostras/bandeja observados a partir de septiembre, juntamente con el aumento de la mortalidad a partir de diciembre pueden ser explicados por lo que diversos autores denominan de fenómeno de auto-raleo o self-thinning (Westoby, 1984; Hughes & Griffiths, 1988; Fréchette & Lefaivre, 1990; Pertraitis, 1995; Fuentes *et al.*, 2000; Cubillo, 2012). Este proceso ocurre cuando los organismos son cultivados a altas densidades y con el pasar del tiempo incrementan su talla o biomasa y pasan a competir por espacio y alimento. Los primeros síntomas de este proceso son la ralentización del crecimiento seguido de un incremento de la mortalidad, ambos como mecanismos de ajuste del tamaño de la población con relación a los recursos disponibles.

Este proceso de self-thinning ha sido descrito para moluscos salvajes (Hughes y Griffiths, 1988; Pertraitis, 1995; Guñes y Castilla, 1999; Guñez, 2005) y cultivados (Fréchette y Bourget, 1985; Boromthanasri y Deslous-Paoli, 1988; Fréchette *et al.*, 1992; Lauzon-Guay *et*

al., 2005; Filgueira *et al.*, 2008 ; Lachance-Bernard *et al.*, 2010) y en ambos casos, el incremento de la competencia intraespecífica conlleva a una inhibición en la alimentación y descensos en la tasa de crecimiento y supervivencia. La disminución de la talla puede deberse a la pérdida de los bordes al rozar unas ostras con otras (y detenerse el crecimiento) y/o a la mayor mortalidad en las ostras de mayor talla.

La producción por unidad de cultivo, que es obtenida a través de los datos de peso total y supervivencia, presentó valores superiores en el sistema de jaulas desde el inicio del experimento, una vez que la capacidad individual de las jaulas es superior a cuerdas. Los valores en ambos los sistemas incrementan con el avance del cultivo, sin embargo, las ostras cultivadas en jaulas empiezan a disminuir el crecimiento y aumentar la mortalidad, lo que conlleva a una disminución de los valores de producción por unidad de cultivo, haciendo con que al final del estudio los valores de producción por unidad de cultivo fuesen mayores en el sistema de cuerdas.

La presencia de cámaras de gel ha presentado un porcentaje máximo del 20% en las ostras cultivadas en cuerdas y de un 80% en las ostras cultivadas en jaulas. Esta afectación fue descrita por diversos autores (Alzieu *et al.*, 1982; Alzieu y Héral, 1984; Rodríguez y López, 1985; Héral *et al.*, 1989) como una respuesta a la contaminación por tributilestaño (TBT) utilizado para la pintura de embarcaciones como un método preventivo a las incrustaciones. La menor incidencia de cámaras de gel en las ostras cultivadas en cuerdas, nos lleva al planteamiento de otras causas para este fenómeno que no el TBT, una vez que estas ostras están más expuestas a las variaciones ambientales además de tener una mayor capacidad filtradora. Una de las posibles explicaciones para el menor porcentaje de afectación en las ostras cultivadas en cuerdas es la mayor cantidad de energía acumulada en estas ostras, lo que puede ser observado por la superioridad significativa de la cantidad de carne medida a través del peso húmedo y seco de las partes blandas, durante todo el periodo de estudio. Esta mayor cantidad de energía en las ostras de cuerda parece ser suficiente para satisfacer las necesidades en los momentos del año de mayor utilización de la energía (reproducción + mantenimiento + crecimiento), no llevando a problemas de calcificación en la formación de las conchas.

Por otro lado, las ostras cultivadas en jaulas presentan menor cantidad de energía la cual parece “faltar” en los momentos del año de mayor utilización, llevando al incremento de la aparición de las cámaras de gel. Este fenómeno también está relacionado con el aumento de las temperaturas, una vez que los datos de presencia de cámaras de gel en jaulas empiezan a incrementarse en verano llegando a sus valores máximos en octubre, lo que está de acuerdo con lo descrito por Héral *et al.* (1981).

En este trabajo, se ha comparado por primera vez el cultivo de *C. gigas* en batea utilizando los sistemas de cultivo en jaula y cuerda. A través de esta comparación se ha podido establecer que las ostras cultivadas en cuerda presentan un incremento constante en longitud,

anchura y peso, además de valores muy superiores de peso húmedo y seco de las partes blandas, y una menor afectación por cámaras de gel, llegando al momento de mayor venta del año (diciembre) con un 0% de afectación. Por otra parte, el sistema de jaulas presenta crecimiento continuo durante los primeros cuatro meses de cultivo, sin embargo a partir de septiembre el efecto de la aglomeración reduce el crecimiento haciendo con que los valores finales de los parámetros productivos evaluados disminuyesen al final del cultivo. Por lo tanto, se puede suponer que las jaulas, plantean un sistema menos favorable por la disminución de la circulación del agua debido principalmente a las incrustaciones externas en la malla, además de una mayor competencia por el alimento y espacio entre ostras, por lo que hay un menor crecimiento.

Si evaluásemos el presente estudio desde un punto de vista productivo, donde lo que cuenta es la cantidad de individuos que llegan a una talla comercial en un menor tiempo posible, tendríamos, que el sistema de jaulas es superior al sistema de cuerdas. Esta afirmación puede ser explicada por la mayor producción por unidad de cultivo en el mayor momento de venta del año (Diciembre), además de las ostras presentaren una talla comercial (peso medio de $65,79 \pm 9,11$ g) que es la más apreciada en el mercado francés (explicación en el capítulo 8).

Otro factor que determina la viabilidad productiva de un sistema de cultivo es la supervivencia. En los dos sistemas de cultivo utilizados los valores de supervivencia no presentaron diferencias significativas hasta diciembre, momento de mayor venta del año.

De esta forma, el sistema de jaulas se presenta como una alternativa viable para el cultivo de *C. gigas* en Galicia, alcanzando la talla comercial en 8 meses de cultivo, con valores de producción y supervivencia elevados. Sin embargo, pasado este periodo, el sistema de jaulas empieza a afectar drásticamente el crecimiento y supervivencia de las ostras cultivadas. Una sugerencia para este cultivo en las condiciones presentes en la Ría de Arousa sería la disminución de la densidad mediante la venta de las ostras que llegaron a talla comercial.

Queda clara la necesidad de estudios que evalúen la relación coste:producción de los dos sistemas utilizados.

7.5. CONCLUSIONES

- Durante todo el período de estudio las ostras cultivadas en cuerda presentan un incremento constante en longitud, anchura y peso, además de valores muy superiores de peso húmedo y seco de las partes blandas, y una menor afectación por cámaras de gel.
- Las ostras cultivadas en jaulas presentan crecimiento significativo de los parámetros productivos durante los primeros cuatro meses de cultivo, lo que apunta la viabilidad de este sistema, durante este periodo, desde el punto de vista biológico y productivo.
- El sistema de jaula empieza a notar el fenómeno de auto-raleo a partir del quinto mes de cultivo, con detención del crecimiento y aumento de la mortalidad, por lo que se recomienda una disminución de la densidad, con el fin de mantener el crecimiento de los parámetros productivos. Por otro lado, las ostras cultivadas en cuerdas no presentan el fenómeno de auto-raleo, como indica el crecimiento constante de los parámetros productivos y la baja mortalidad.
- El índice de forma 1, que relaciona la anchura con la longitud, fue eficiente en la separación de las ostras con relación al umbral determinado.
- El sistema de jaula alcanzó la máxima producción a los seis meses de cultivo, verificando su viabilidad desde el punto de vista productivo.
- La diferente presencia de cámaras de gel en los sistemas de cuerda y jaula, inducen a plantear la importancia de la acumulación de energía en este tipo de proceso, y apuntarían a las restricciones energéticas en los momentos de mayor requerimiento energético para el crecimiento de concha y para la gametogénesis, como causa de la aparición de cámaras de gel en las ostras cultivadas en jaulas.
- Las jaulas plantean un sistema menos favorable por la disminución de la circulación de agua debido principalmente a las incrustaciones externas en la malla, además de una mayor competencia por el alimento y espacio entre ostras, por lo que hay un menor crecimiento.

**8. EFECTO DE LA DENSIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO DE
LA OSTRAS *Crassostrea gigas* CULTIVADA EN BATEA**

EFECTO DE LA DENSIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA OSTRA *Crassostrea gigas* CULTIVADA EN BATEA

8.1. INTRODUCCION

De acuerdo con la FAO, la contribución de la acuicultura a la disponibilidad de peces, crustáceos, moluscos y algas continúa creciendo más rápido que todos los otros sectores productores de alimentos, siendo responsable en el año de 2010 del 46% de todo pescado consumido mundialmente, con una producción de 79 millones de toneladas (FAO, 2012).

El cultivo de moluscos es un área dentro de la acuicultura mundial que se viene expandiendo rápidamente, representando el 23,6% de la producción del sector, con 14,6 millones de toneladas en el año de 2010 (FAO, 2012). La ostra japonesa *Crassostrea gigas* presentó en el año de 2010 una producción de aproximadamente 4,3 millones de toneladas, siendo el principal molusco producido en el mundo (FAO, 2013a).

Las formas de cultivo de moluscos son muy antiguas y la mayor parte de las referencias se pierden en el tiempo, pero algunas relatan que los japoneses ya cultivaban ostras en el año 2000 a.C. (Iversen, 1971). Akaboshi *et al.* (1979), sin embargo, afirman que los japoneses se destacan entre los primeros productores de ostra en el mundo, cultivando la ostra *C. gigas* desde 1673. Por otro lado, hay referencias de cultivo de ostras desde la época romana, cuando Sergius Orata realizó un crecimiento de ostras en el Lago Lucrim (Eyton, 1958). Aristóteles cita el cultivo de ostras en Grecia y Plinio relata detalles acerca del cultivo de ostras en Roma en el año 100 a.C. (Milne, 1972). En Francia y Holanda los métodos de cultivo de ostras y mejillones a gran escala se apoyan en técnicas de cultivo con más de un siglo de antigüedad (Kirk, 1979).

En Galicia, el cultivo de ostras estaba basado en la ostra plana *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758); sin embargo, debido a la sobreexplotación y la incidencia del parásito *Marteilia refringens* en primera instancia y posteriormente una segunda infección masiva provocada por *Bonamia ostreae* (Montes *et al.*, 1990), hizo con que el cultivo de esta especie se volviera inviable.

Con vistas a mantener la ostricultura gallega, se permitió la importación de la ostra *Crassostrea gigas* con carácter experimental. En 1991 se autorizaron las primeras pruebas de cultivo de *C. gigas* en 16 bateas, con el fin de valorar la viabilidad de esta especie desde un punto de vista productivo y ecológico (Xunta de Galicia, 1992). Desde entonces y hasta el presente, los productores han continuado su actividad en el marco de estas autorizaciones. Su introducción en Galicia en 1991 supuso un gran avance en el sector ostrícola, por su mayor resistencia y rapidez de crecimiento en comparación con la ostra plana *Ostrea edulis* de cultivo tradicional y autóctona de esta zona (Fernández *et al.*, 2002). Pero aún existe una gran necesidad

de estudios más profundos acerca del cultivo de *C. gigas* en las condiciones ambientales de las zonas de cultivo de las costas gallegas.

Un cultivo de ostras exitoso depende en gran medida de la adaptación de las prácticas de manejo a las características locales. En otras palabras, la metodología específica utilizada para una determinada especie en un lugar específico pueden promover mejores resultados y aumentar la productividad (Maccachero *et al.*, 2007).

Una importante cuestión en el cultivo de moluscos es determinar cuál es el número máximo de individuos de una cierta especie que puede ser cultivado en una estructura de cultivo, antes de que su crecimiento sea limitado o que los valores de mortalidad se vuelvan inaceptables. En otras palabras, ¿cuál sería la densidad de cultivo óptima? Es sabido que altas densidades pueden disminuir la tasa de crecimiento de bivalvos (Fréchette y Bourget, 1985), posiblemente debido a la limitación de alimento a altas densidades (Harvey y Vincent, 1991; Vincent *et al.*, 1994). En contraposición, una densidad baja puede incluso incrementar la variabilidad en la masa corporal, dado que algunos individuos crecen más rápido que otros (Kautsky, 1982; Jarayabhand, 1988). Incluso con una pequeña cobertura superficial de la estructura de cultivo, donde hay una mayor distancia entre los individuos, puede haber disminuciones significativas en el crecimiento (Peterson, 1982; Peterson y Black, 1987).

Un gran número de estudios han evaluado el efecto de la densidad de cultivo en diversas especies de bivalvos de interés económico (Jarayabhand, 1988; Holliday, 1991; Taylor 1997a, b; Newell, 1990). Todos estos estudios han demostrado que la densidad presenta un importante efecto negativo en el crecimiento individual. Por otra parte cuando se evalúa la supervivencia, no se observa relación con la densidad (Holliday *et al.*, 1991; Côté *et al.*, 1993; Mgaya y Mercer, 1995; Hurley y Walker, 1996).

Sin embargo, en Galicia la ostra japonesa *Crassostrea gigas* presenta poca producción y aun no se han determinado las mejores técnicas de cultivo, así como las mejores densidades de cultivo de esta especie para las condiciones de las Rías gallegas. De esta forma, el presente capítulo evalúa el efecto de diferentes densidades de cultivo en el crecimiento, tiempo de cultivo y supervivencia de *C. gigas* cultivada en las jaulas patentadas por el IEO en la Ría de Arousa, buscando determinar la mejor densidad con relación a la cantidad y calidad producida.

8.2. MATERIAL Y MÉTODOS

8.2.1. Área de cultivo y muestreo

Las semillas de ostra utilizadas en este estudio fueron traídas de la Bahía de Arcachon (Francia) en el mes de marzo de 2008 y permanecieron en aclimatación en la batea durante tres semanas antes del comienzo del cultivo. El experimento se inició en las estructuras de cultivo en el día 16 de abril de 2008.

La batea utilizada posee las dimensiones estándar (25x25m) y está ubicada en la Ría de Arousa, en el Polígono A7 de O Grove.

Las ostras fueron mantenidas en estructuras de cultivo, denominadas jaulas, patentadas por el IEO. Las jaulas son estructuras cilíndricas compuestas por bandejas plásticas circulares envueltas por una malla externa intercambiable. Se utilizaron en cada jaula 6 bandejas circulares (con un diámetro de 0,36 m, altura de 0,15 m y una superficie de 0,1 m²) recubiertas por una malla de 10 mm.

Los valores iniciales de peso total, longitud y anchura de las ostras fueron de $5,31 \pm 0,89$ g, $37,95 \pm 6,02$ mm y $23,66 \pm 2,03$ mm, respectivamente. Durante la primera etapa, el cultivo se realizó a densidades de 100, 200 y 400 ostras/bandeja, lo que supone un número de ostras por metro cuadrado de 1000, 2000 y 4000 respectivamente. El número inicial de ostras fue establecido en base a las cantidades utilizadas por los bateiros en la Ría de Arousa, siendo la densidad intermedia la comúnmente utilizada. Para cada densidad de cultivo en jaula se realizaron tres replicas.

Las ostras se mantuvieron durante dos meses con estas densidades. Después de este periodo se inicia la segunda etapa, en la que, se desdoblaron las dos densidades más altas (200 y 400 ostras/bandeja) formando tres nuevas densidades 40, 60 y 80 ostras/bandeja, que suponen una área de cobertura superficial de 400, 600 y 800 ostras por metro cuadrado respectivamente. La densidad de 100 ostras/bandeja se mantuvo sin variación.

Los muestreos fueron realizados durante el periodo de 16/04/2008 hasta 19/05/2009. En cada muestreo se evaluaron 40 ostras de una bandeja de cada jaula, obteniéndose los datos de longitud, anchura y altura con un calibre con una precisión de 0,1 mm y el peso total utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Para la determinación de la supervivencia, en cada muestreo, se anotó el número de individuos muertos, manteniéndose los mismos en las estructuras de cultivo para no alterar las densidades.

Con los datos de peso total y supervivencia, se ha podido calcular la producción por unidad de cultivo, siendo este parámetro determinado como el número de individuos vivos multiplicado por el peso unitario en cada muestreo. La determinación de estos valores resulta

muy importante, desde un punto de vista productivo, para estimar el momento en el que se debe terminar el cultivo.

En cada muestreo se procedió la limpieza de la red exterior que recubre las jaulas de cultivo, cambiándola en los casos en que su deterioro lo hizo necesario.

8.2.2. *Peso húmedo y peso seco de las partes blandas*

En cada muestreo, 10 ostras de cada tratamiento fueron llevadas al Centro Oceanográfico de A Coruña del IEO para la determinación del peso húmedo y peso seco de las partes blandas. Para ello, las ostras fueron abiertas y obtenidos los datos de peso húmedo de las partes blandas utilizando una balanza con una precisión de 0,001 g. Posteriormente se obtuvo el peso seco de las partes blandas a través de la liofilización de la carne durante 48 h en un liofilizador.

La densidad de 60 ostras/bandeja no fue analizada con relación a los pesos húmedos y secos de las partes blandas y valvas.

8.2.3. *Presencia de cámaras de gel*

Para evaluar la calidad de las ostras en cuanto a su aspecto, se analizó la presencia de cámaras de gel, dato que permite determinar el grado de malformaciones de la concha. Estas cámaras presentan habitualmente en su interior una sustancia de naturaleza proteínica, con consistencia de gel, que confiere a las ostras un aspecto desagradable y si son perforadas pueden desprender un mal olor (Iglesias *et al.*, 2005).

Para la determinación de este índice se examinaron mensualmente las valvas de 40 ostras y se calcularon los siguientes índices A y B de afectación por cámaras de gel propuestos por Alzieu *et al.* (1986): A - porcentaje de afectación de una de las valvas, normalmente la valva derecha y B - porcentaje de afectación de ambas valvas simultáneamente.

La densidad de 60 ostras/bandeja no fue analizada con relación al porcentaje de afectación por cámaras de gel.

8.2.4. *Índices de forma (IF)*

Se han calculado los índices de forma descritos por Brake *et al.* (2003), que emplean las relaciones:

$$IF1 = \text{anchura/longitud}$$

$$IF2 = \text{altura/longitud}$$

Estos índices permiten separar las ostras que presentan valores superiores al umbral de 0,63 para el IF1 y 0,25 para el IF2, a partir de los cuales la forma de las ostras sería adecuada para el mercado.

La densidad de 60 ostras/bandeja no fue analizada con relación al índice de forma.

8.2.5. Variables ambientales

Los datos de temperatura y salinidad en la columna de agua a una profundidad de 0-5 metros, fueron obtenidos, por una sonda CTD Sea-Bird 25. Los datos de clorofila *a* fueron obtenidos por el filtrado a presión constante de un volumen de 100 mL de agua a una profundidad de 0-5 metros, separando las partículas en dos clases $>2,7\mu\text{m}$ y $<2,7\mu\text{m}$, las cuales fueron sumadas para representar el dato de clorofila *a*. La extracción de la clorofila *a* presente en los filtros de fibra de vidrio realizase en acetona al 90% resfriada y en oscuridad por no menos que 14 horas. Posteriormente se analizan por espectrofotometría por medio de una ecuación tricromática, siguiendo el método de Neveux y Panouse (1987). Todos los datos fueron obtenidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia, en una estación meteorológica ubicada cercana a la batea de cultivo en el polígono A7 de O Grove. Estos datos fueron proporcionados por el INTECMAR en el marco de un convenio entre éste y el IEO para la toma de datos oceanográficos en las Rías Gallegas.

8.2.6. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Plus 5.1. Para todos los datos se analizó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, cuando presentaban el mismo número de datos y de Bartlett cuando presentaban un número distinto. Cuando los datos son normales y las varianzas homogéneas se realizó el Análisis de Varianza simple (ANOVA) y en los casos en que los datos no se adecuaron a la distribución normal o las varianzas no fueron homogéneas se utilizó el Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis. Para los tests a posteriori se utilizaron el test de Student-Newman-Keuls (SNK) para los datos analizados por ANOVA y el test Mann-Whitney, comparando datos pareados, cuando los datos seguían una distribución no paramétrica. En todos los casos se utilizó un α de 5%.

Los datos de supervivencia fueron transformados utilizando la transformación arcoseno.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. Crecimiento en longitud y anchura

La Figura 8.1 describe el crecimiento en longitud y anchura de las ostas durante la primera etapa de cultivo (abril hasta junio de 2008). Como puede verse en esta figura, durante este período se produce un rápido crecimiento que, en el caso del crecimiento en longitud, no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$, ANOVA) entre las densidades testadas (Figura 8.1a). Con relación a la anchura (Figura 8.1b), los datos presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) con respecto a la densidad, con una relación inversamente proporcional a la densidad de cultivo, de manera que el valor más alto de anchura se corresponde con la densidad más baja.

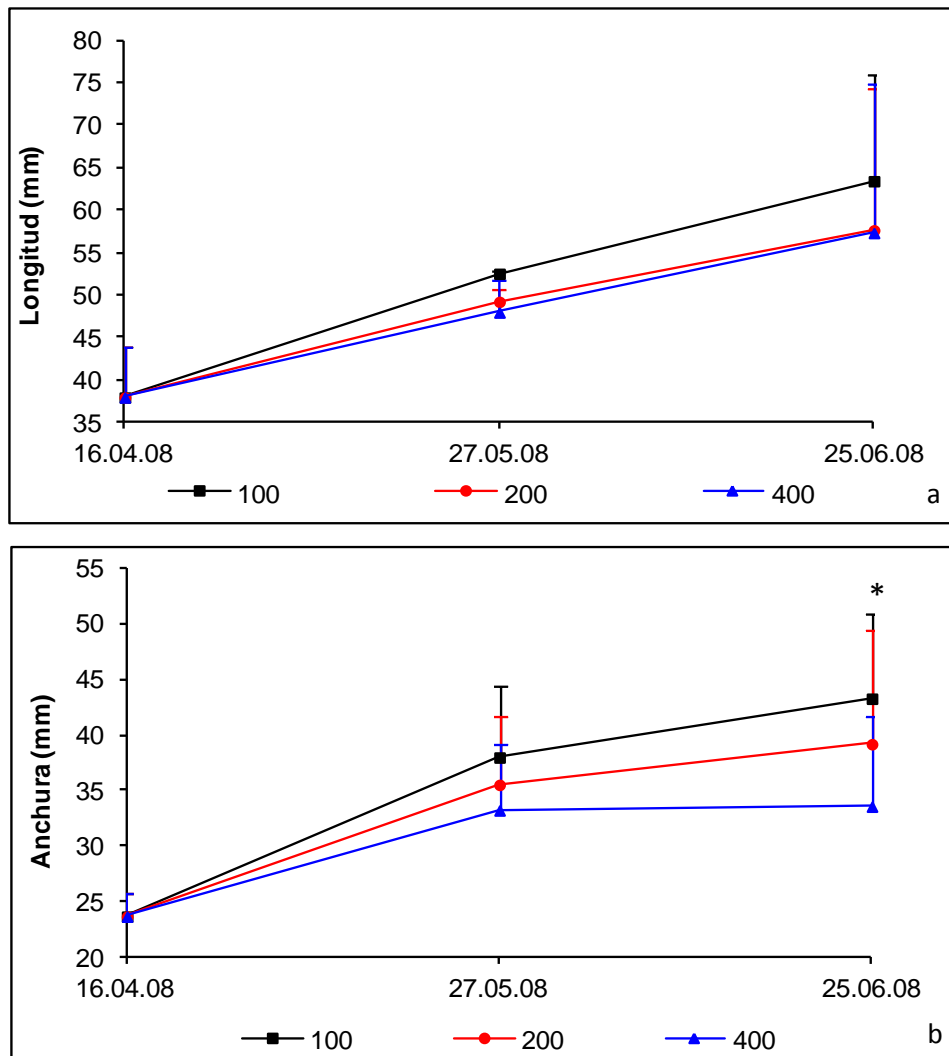


Figura 8.1. Evolución de la longitud (mm) (a) y anchura (mm) (b) de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa de crecimiento (dato medio + de). La presencia de un asterisco denota diferencia significativa.

Durante la segunda etapa del cultivo, el crecimiento se modera, y se observa como las diferentes densidades de cultivo influyen sobre el crecimiento en longitud (Figura 2), aunque las diferencias no resultan significativas hasta el muestreo final de la experiencia (mayo/09), donde la densidad de 100 ostras/bandeja fue significativamente inferior ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) a las otras densidades evaluadas (Tabla 1).

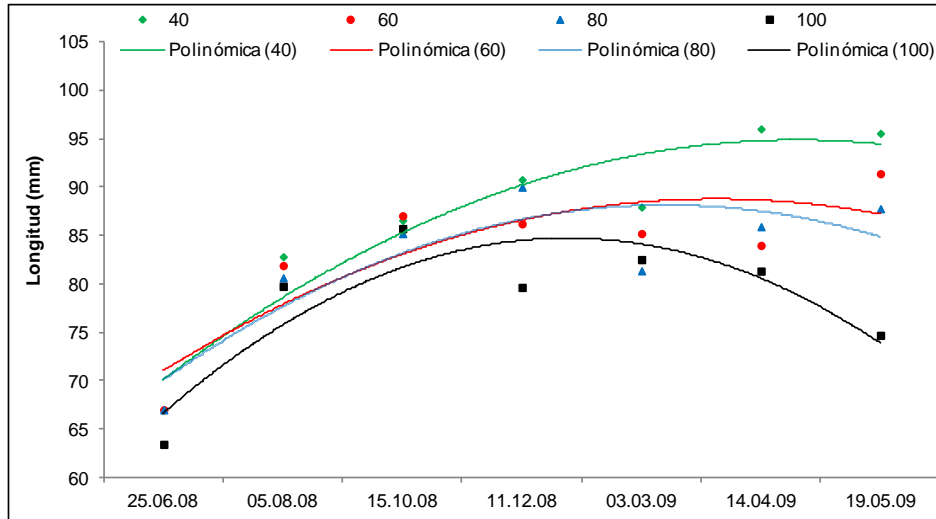


Figura 2. Evolución de la longitud (mm) y de las curvas polinómicas de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 2ª etapa de crecimiento.

El crecimiento en anchura se comporta de forma semejante al crecimiento en longitud, existiendo una relación directa entre el tamaño y la densidad de cultivo (Figura 3), aunque, como en el caso anterior, las diferencias sólo resultan significativas en el último muestreo, en el cual la anchura de las ostras de la densidad de 40 ostras/bandeja fue significativamente superior a la densidad de 100 ostras/bandeja (Tabla 1, $P < 0,05$, ANOVA, SNK).

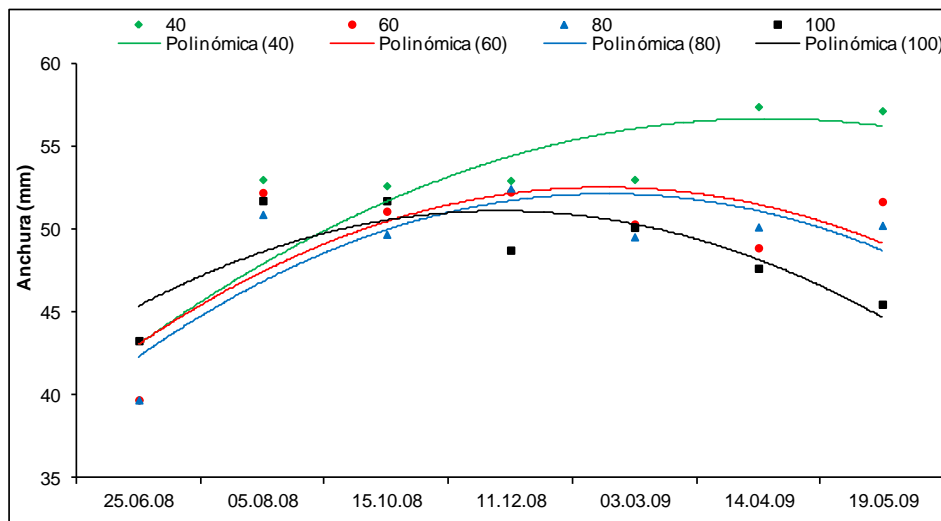


Figura 3. Evolución de la anchura (mm) y de las curvas polinómicas de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 2ª etapa de crecimiento.

Tabla 1. Resultados obtenidos del ANOVA de dos vías testando el efecto de la densidad de cultivo y del periodo de muestreo sobre los valores medios de longitud (mm), anchura (mm), peso total (g), peso fresco carne (g) y peso seco carne (g) de ostras cultivadas en jaulas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Longitud				
Densidad	3	807,1	269,0	7,30***
Mes	5	317,7	63,5	1,72
Densidad:mes	15	655,8	43,7	1,19
Error	49	1807,1	36,9	
Anchura				
Densidad	3	264,8	88,3	8,63***
Mes	5	11,3	2,3	0,22
Densidad:mes	15	206,5	13,8	1,35
Error	49	501,2	10,2	
Peso total				
Densidad	3	4431,0	1477,0	13,32***
Mes	5	4270,4	854,1	7,70***
Densidad:mes	15	3356,0	223,7	2,02*
Error	49	5431,2	110,8	
Peso fresco carne				
Densidad	2	339,802	169,901	14,98***
Mes	5	296,743	59,349	5,23***
Densidad:mes	10	366,062	36,606	3,23***
Error	149	1690,145	11,343	
Peso seco carne				
Densidad	2	14,1376	7,0688	14,84***
Mes	5	21,5980	4,3196	9,07***
Densidad:mes	10	17,0124	1,7012	3,57***
Error	149	70,9624	0,4763	

(*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

8.3.2. Índices de forma (IF)

Cuando se analizan los datos del índice de forma 1, que relaciona anchura y longitud, para las distintas densidades de cultivo en jaula, se observa que durante la primera etapa (Figura 4a), el IF1 fue superior al umbral de 0,63, descrito por Brake *et al.* (2003) como el valor mínimo a partir del cual la forma de las ostras sería adecuada para el mercado, en las ostras cultivadas a 100 y 200 ostras/bandeja, mientras que en la densidad de 400 ostras/bandeja este valor no fue alcanzado.

Durante la segunda etapa (Figura 4b) el promedio del IF1 solamente fue superior a 0,63 en la densidad de 40 ostras/bandeja e igual a 0,63 para la densidad de 100 ostras/bandeja, en los muestreos del 05/08/2008 y 15/10/2008.

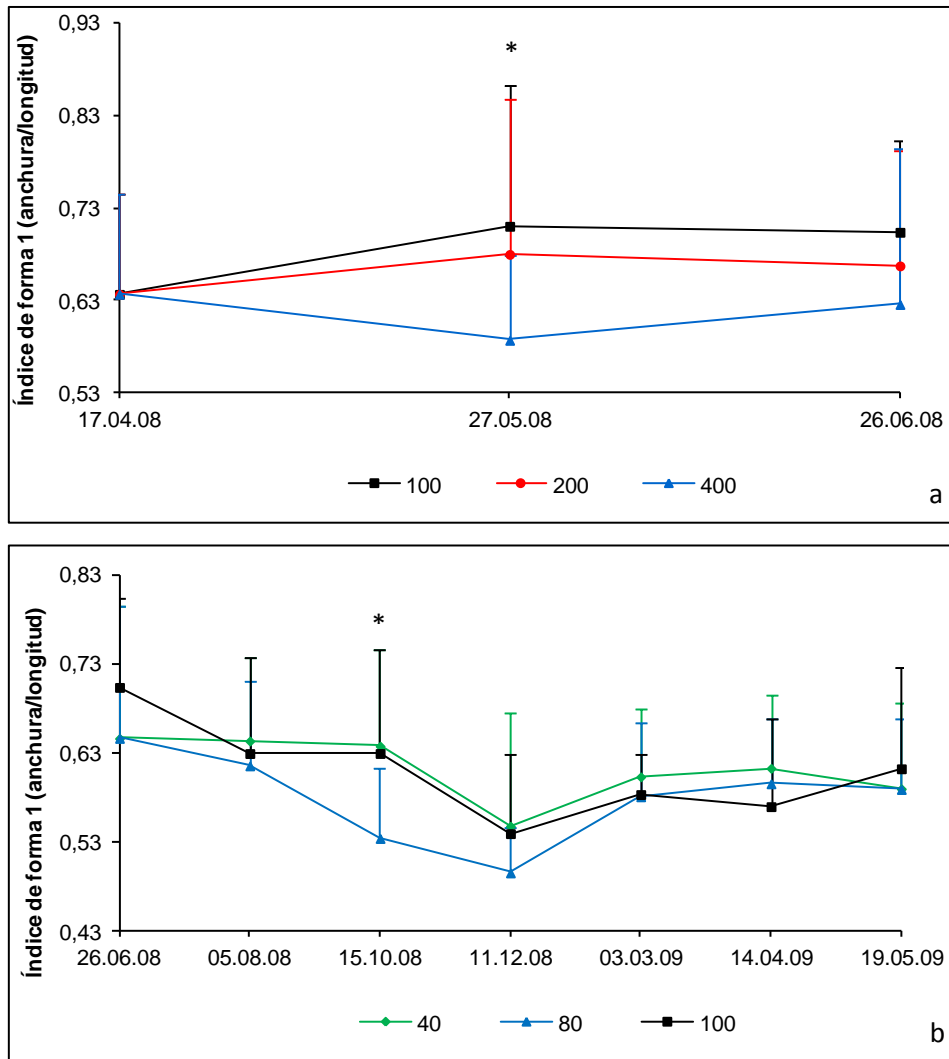


Figura 4. Evolución del Índice de forma 1 en *C. gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y 2ª etapa del cultivo (b). La presencia de un asterisco denota diferencia significativa.

El IF 2, que relaciona la altura con la longitud, fue superior al umbral de 0,25 descrito por Brake *et al.* (2003), en todos los tratamientos utilizados durante todo el periodo del cultivo (Figura 5).

Durante la primera etapa del cultivo, las ostras mantenidas en la densidad de 400 ostras/bandeja presentaron valores significativamente inferiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) a las otras densidades evaluadas. Durante la segunda etapa, los tratamientos utilizados no presentaron diferencia significativa ($P > 0,05$, ANOVA), con una única excepción observada en el muestreo de octubre, en el cual las ostras cultivadas bajo la densidad de 80 ostras/bandeja presentaron valores significativamente inferiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) a los otros tratamientos.

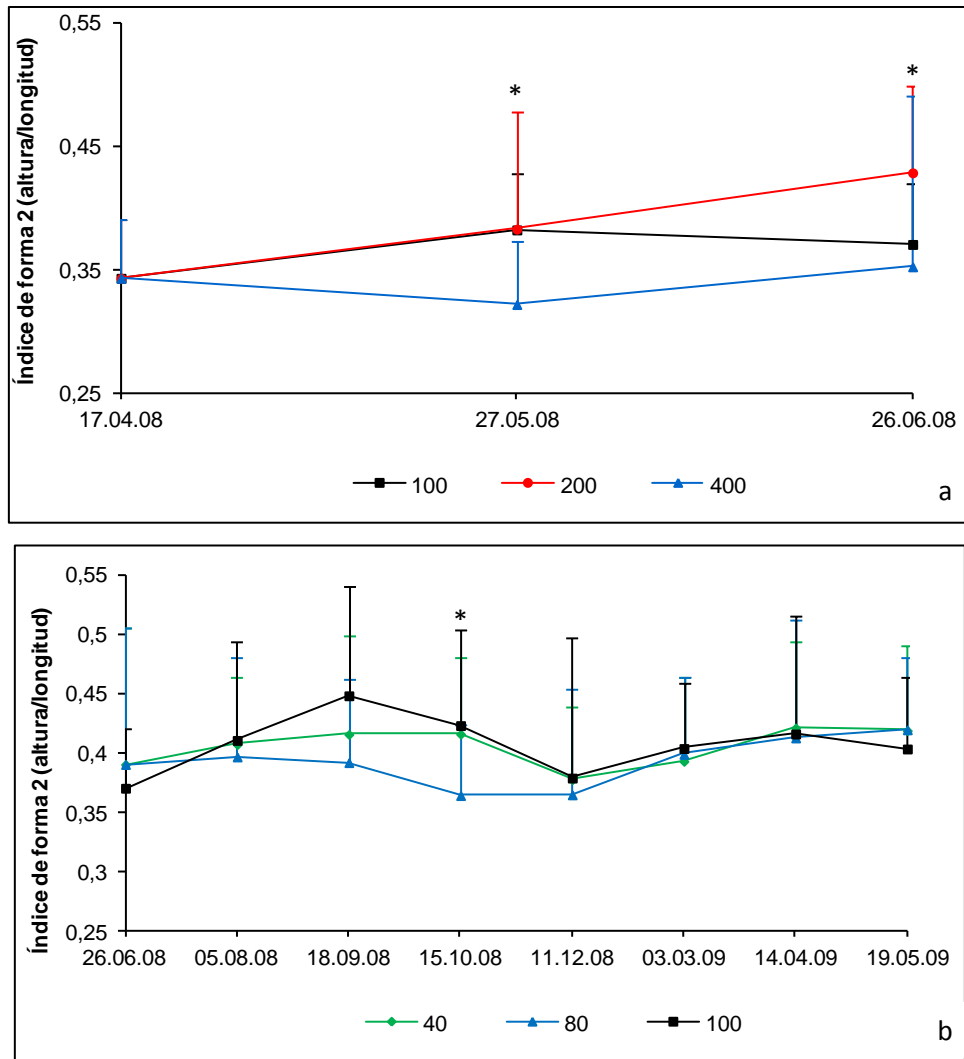


Figura 5. Evolución del Índice de forma 2 en *C. gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y 2ª etapa del cultivo (b). La presencia de un asterisco denota diferencia significativa.

8.3.3. Peso total

La evolución del peso total durante el período de estudio puede ser observada en las figuras 6 y 7, primera y segunda etapa respectivamente. Durante la primera etapa de cultivo, la densidad más baja (100 ostras/bandeja) presentó valores superiores significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) con respecto a las otras densidades, alcanzando, al final de la primera etapa, un peso medio de $30,70 \pm 2,09$ g.

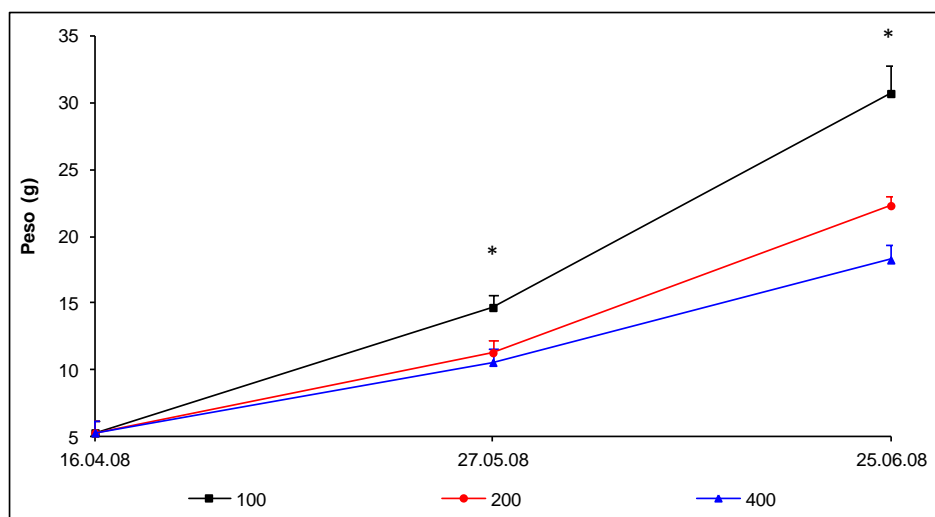


Figura 6. Evolución del peso total (g) de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (dato medio + de). La presencia de un asterisco denota diferencia significativa.

En la figura 7 se representa la evolución del peso durante la segunda etapa. La densidad de cultivo, así como el tiempo de cultivo influyeron significativamente en el incremento en peso total (Tabla 1, $P < 0,05$, ANOVA).

En los primeros meses de cultivo (junio hasta diciembre de 2008) las ostras en todas las densidades presentaron incrementos en el peso que no difirieron significativamente ($P > 0,05$, ANOVA). Durante los meses de marzo y abril de 2009, la ostras cultivadas bajo la densidad de 40 ostras/bandeja presentan un incremento en peso, alcanzando valores medios significativamente superiores a las otras densidades evaluadas ($P < 0,05$, ANOVA, SNK), las cuales o mantuvieron su peso o redujeron los mismos. En el último muestreo, ocurrió un incremento del peso de las ostras cultivadas en las densidades de 60 y 80 ostras/bandejas, alcanzando valores que no difirieron significativamente ($P > 0,05$, ANOVA) de la densidad de 40 ostras/bandeja. Sin embargo, las ostras cultivadas bajo la densidad de 100 ostras/bandeja presentaron una reducción en su peso promedio, el cual es significativamente inferior a todas las otras densidades evaluadas ($P < 0,05$, ANOVA, SNK).

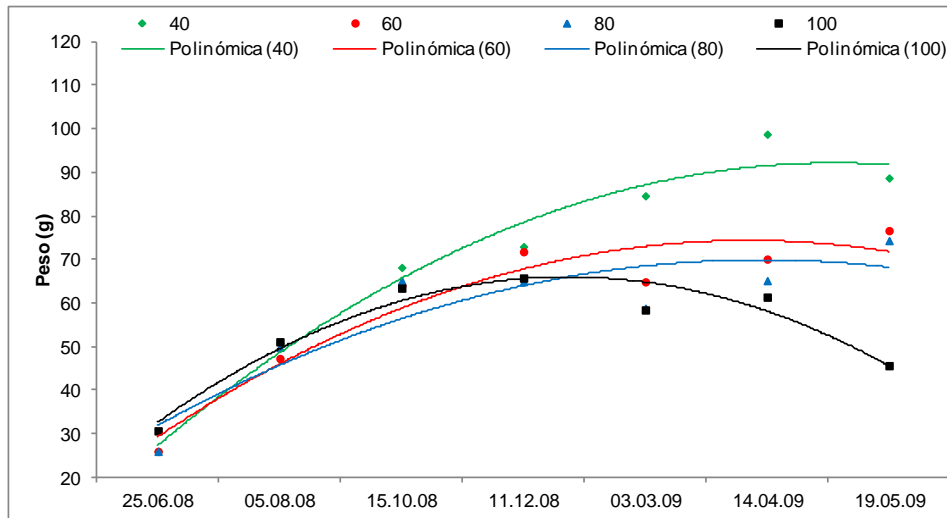


Figura 7. Evolución del peso total (g) y de las curvas polinómicas de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 2ª etapa de crecimiento.

8.3.4. Supervivencia

La supervivencia durante la primera etapa de cultivo presentó un valor medio superior al 97% (Figura 8a), sin que se observaran diferencias significativas entre las densidades evaluadas ($P > 0,05$, ANOVA).

En la segunda etapa de cultivo, la supervivencia fue disminuyendo de forma continuada, hasta alcanzar al final de la presente experiencia valores en algunos casos próximos al 50% (Figura 8b).

Al analizar los datos de supervivencia durante la segunda etapa (Figura 8b), se ha podido observar que durante el primer mes (05/08/08) las densidades de 40 y 60 ostras/bandeja presentaron valores significativamente ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) superiores al resto de las densidades, seguidos por el valor de la supervivencia a 100 ostras/bandeja y por último a 80 ostras/bandeja. En el muestreo de diciembre, momento del año de mayor venta y cuando las ostras cultivadas en todas las densidades han alcanzado la talla comercial, las supervivencias no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$, ANOVA), registrando valores superiores al 70% en las densidades de 40, 60 y 100 ostras/bandeja y el valor de 68,6% en la densidad de 80 ostras/bandeja.

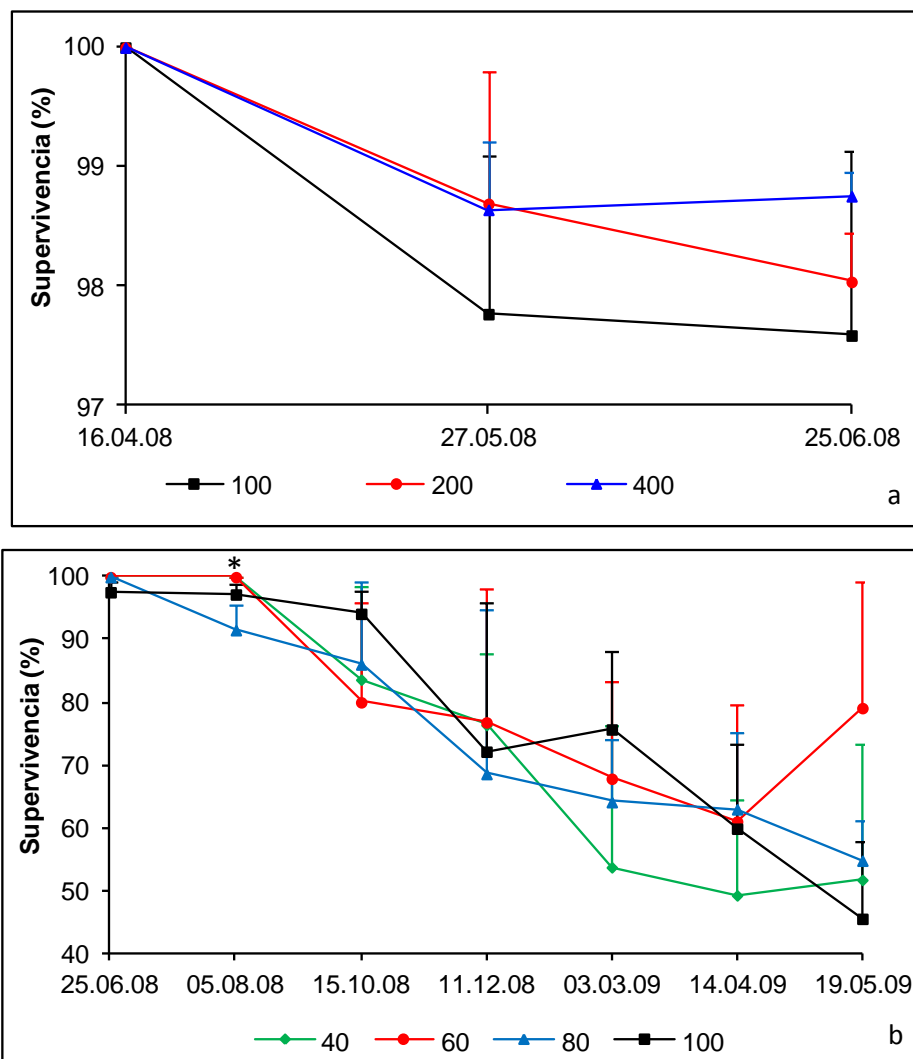


Figura 8. Evolución de la supervivencia (%) de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y 2ª etapa (b). La presencia de un asterisco denota diferencia significativa.

En todos los muestreos siguientes los valores de supervivencia observados fueron significativamente ($P > 0,05$, ANOVA) semejantes entre todas las densidades.

8.3.5. Producción por unidad de cultivo

Evaluando los resultados obtenidos en la primera etapa, se ha podido observar que la producción por unidad de cultivo (jaula de 6 bandejas) se incrementa constantemente en todas las densidades evaluadas, obteniendo un valor máximo al final de esta etapa de 39,5 kg en la densidad de 400 ostras/bandeja (Figura 9a).

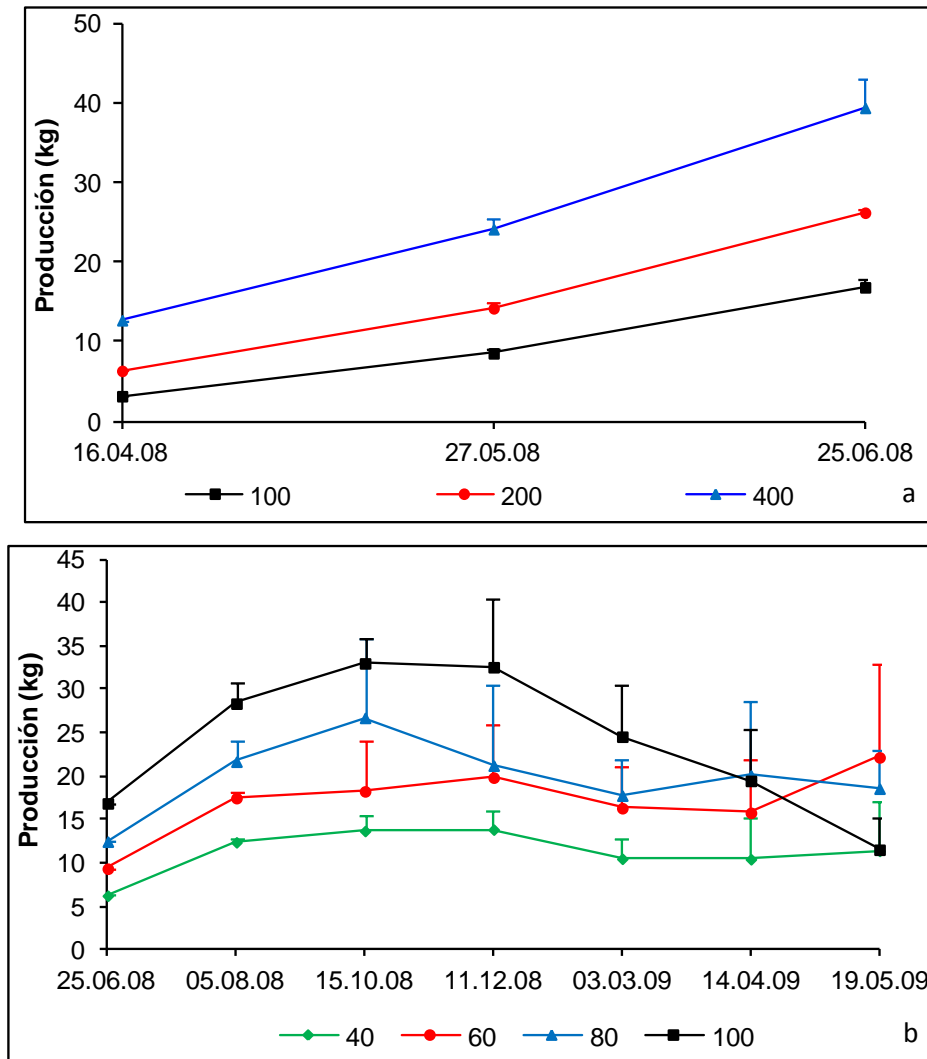


Figura 9. Evolución de la producción por unidad de cultivo (kg) de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y 2ª etapa (b).

En la segunda etapa, todos los tratamientos han aumentando su producción por unidad de cultivo, hasta el muestreo de octubre de 2008. En este momento se alcanzó el máximo de producción para las densidades de 80 (26,7 kg) y 100 (33,0 kg) ostras/bandeja. En la densidad de 40 ostras/bandeja la máxima producción fue alcanzada en el muestreo de diciembre de 2008 (13,9 kg/bandeja) y a la densidad de 60 ostras/bandeja en el último muestreo presentando 22 kg (Figura 9b).

8.3.6. Peso húmedo y peso seco de las partes blandas

La evolución del peso húmedo y del peso seco de las partes blandas puede ser observada en las figuras 10 y 11, respectivamente. Durante la primera etapa de cultivo hay un incremento de los pesos en el primer mes, seguido de una disminución de ambos los pesos en

las ostras cultivadas bajo las densidades de 200 y 400 ostras/bandeja, haciendo con que sus valores medios fuesen significativamente inferiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) a la densidad de 100 ostras/bandeja al final de esta etapa.

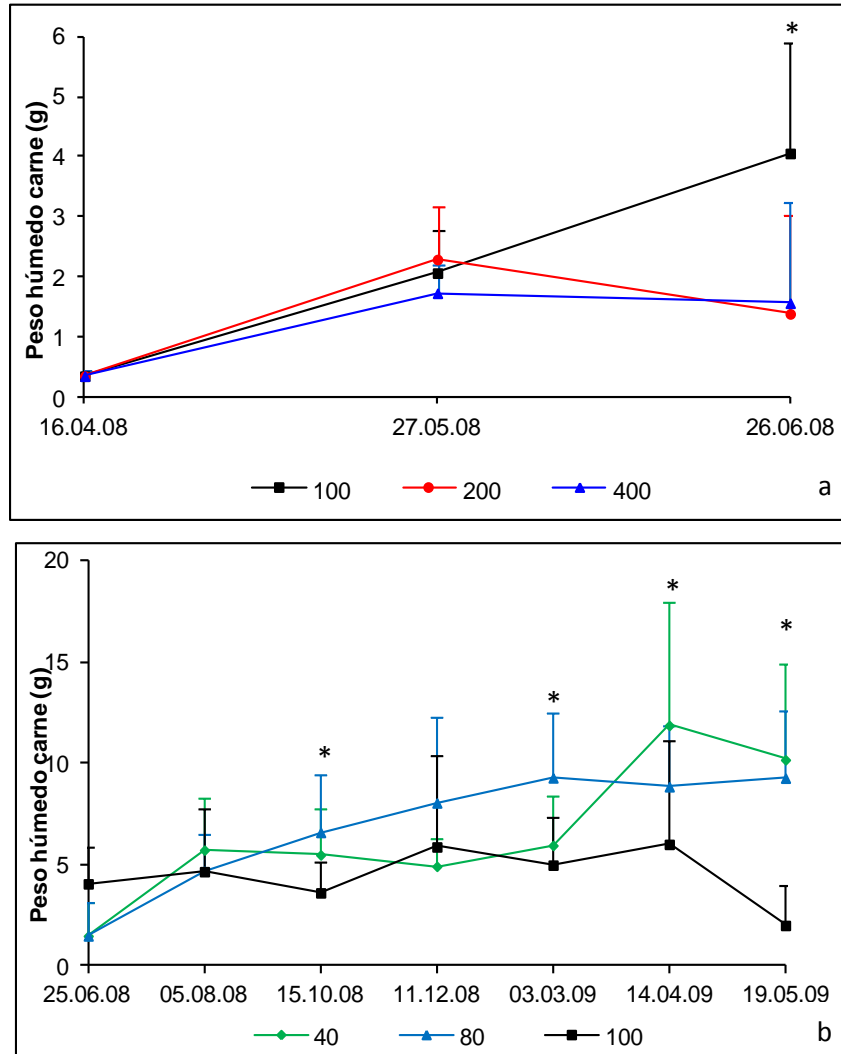


Figura 10. Evolución del peso húmedo de las partes blandas de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y segunda etapa de crecimiento (b) (dato medio + de). La presencia de un asterisco denota diferencia significativa.

Durante la segunda etapa de cultivo la densidad y el tiempo de cultivo presentaron efecto significativo en el incremento en los pesos húmedo y seco de las partes blandas de las ostras cultivadas (Tabla 1, $P < 0,05$, ANOVA). Entre los meses de junio y agosto, los valores de ambos los pesos en las densidades de 40 y 80 ostras/bandeja presentan un incremento, no difiriendo significativamente ($P > 0,05$, ANOVA, SNK) de la densidad de 100 ostras/bandeja. Sin embargo, en el mes de octubre las ostras cultivadas en la densidad de 100 ostras/bandeja presentan una disminución de ambos los pesos, siendo estos significativamente inferiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) a las otras densidades evaluadas.

En los muestreos de 2009 (marzo, abril y mayo) las ostras cultivadas en la densidad de 100 ostras/bandeja presentan valores de peso húmedo y peso seco de las partes blandas significativamente inferiores ($P < 0,05$, ANOVA, SNK) a las densidades de 40 y 80 ostras/bandeja.

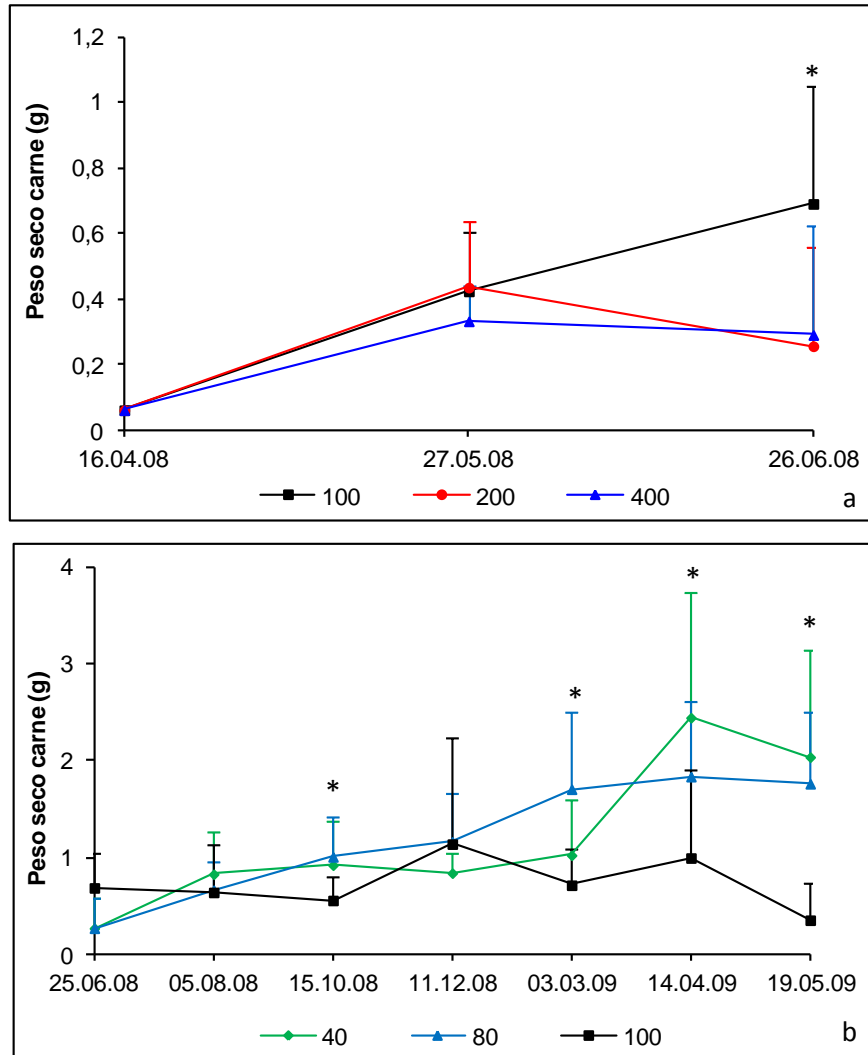


Figura 11. Evolución del peso seco de las partes blandas de *Crassostrea gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y segunda etapa de crecimiento (b) (dato medio + de).

8.3.7. Presencia de cámaras de gel

Durante todo el cultivo no fueron observadas ostras con afectación por cámaras de gel en ambas valvas (índice B), siendo utilizado solamente el índice A (afectación de una de las valvas) para la determinación del porcentaje de individuos con presencia de cámaras de gel.

En la primera etapa no fueron observadas ostras con cámaras de gel en el cultivo con la densidad de 100 ostras/bandeja. Sin embargo, las densidades de 400 y 200 ostras/bandeja

presentaron valores máximos del 10% y 40% respectivamente, en el último muestreo (Figura 12a).

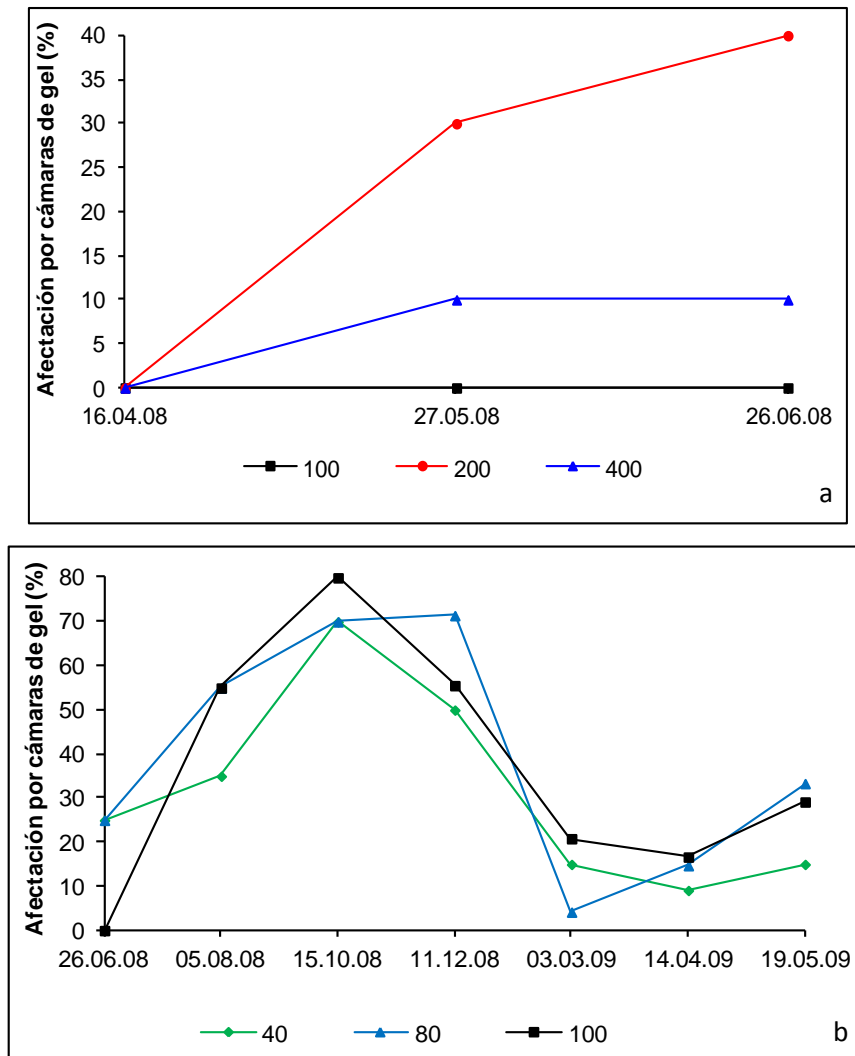


Figura 12. Evolución del Índice A de afectación por cámaras de gel en *C. gigas* cultivada en jaula a diferentes densidades en la Ría de Arousa – 1ª etapa (a) y 2ª etapa del cultivo (b).

La variación de la afectación por cámaras de gel en las ostras cultivadas a diferentes densidades durante la segunda etapa de cultivo se representa en la figura 12b. Las ostras, en todas las densidades, tuvieron un incremento de la afectación por cámaras de gel hasta el mes de octubre, en el que alcanzaron valores máximos iguales o superiores al 70%. Pasado este periodo, hay una rápida disminución de los valores de afectación que alcanzan en los muestreos de marzo y abril de 2009 valores semejantes a los del inicio de esta etapa. A partir de esta fecha, se produce un nuevo incremento de la presencia de cámaras de gel que alcanzan al final del cultivo porcentajes del 15% en la densidad de 40 ostras/bandeja, y valores del 33,3 y 29,2% en las densidades de 80 y 100 ostras/bandeja respectivamente.

8.3.8. Variables ambientales

La evolución de la temperatura se representa en la figura 13a, donde se puede observar que el cultivo ha empezado en el momento del año en que las temperaturas aumentaban, alcanzando el máximo de 18,58 °C en 14/07/2008.

La salinidad ha sido muy constante durante todo el periodo de cultivo, presentando un valor medio de $34,51 \pm 1,35\text{‰}$ (figura 13a). Los valores más bajos de salinidad fueron observados en el invierno de 2009 con el valor mínimo de 28,75‰.

La clorofila *a* ha presentado dos picos durante el año de 2008, uno en primavera (28/04) con 3,423 µg/l y el otro en otoño (22/09) con 3,103 µg/l (figura 13b). En el año de 2009, la evolución de la clorofila *a* fue distinta al año anterior, presentando valores elevados en finales de invierno, con 1,93 µg/l en 16/03 y durante toda la primavera.



Figura 13. Evolución de la temperatura (a), salinidad (a) y clorofila *a* (b) en el Polígono A7 de O Grove, Ría de Arousa durante el período de estudio.

8.4. DISCUSIÓN

El crecimiento en longitud y en anchura, durante la primera etapa del cultivo, ha estado directamente relacionado con las densidades utilizadas, produciéndose los mayores valores a las densidades más bajas. Estos resultados concuerdan con varios autores (Peterson, 1982; Fréchette y Bourget, 1985; Peterson y Black, 1987; Jarayabhand, 1988; Newell, 1990; Holliday, 1991; Taylor *et al.*, 1997 a, b, Román *et al.*, 2003), los cuales ya apuntaban esta tendencia.

Durante la segunda etapa de cultivo, se repite la tendencia observada de mayor crecimiento en las densidades más bajas, sin embargo, este crecimiento no presentó diferencias significativas entre las densidades evaluadas hasta el último muestreo.

El efecto del incremento de la densidad de cultivo en el crecimiento puede ser observado en la densidad de 100 ostras/bandeja, donde las ostras no presentaron incrementos en longitud ni en anchura a partir del muestreo de diciembre de 2008. El bajo crecimiento observado en las densidades más altas puede estar relacionado con dos factores: (1) que la disponibilidad de alimento por individuo a densidades elevadas sea menor comparada con las densidades más bajas (Hadley y Manzi, 1984) y (2) que hay un aumento en el contacto físico entre las ostras, lo que dificulta la total apertura de las valvas y, por consiguiente, la ingestión de alimento (Jørgensen, 1990). Ambos factores parecen actuar en el caso del cultivo en jaulas a altas densidades ya que las ostras en las bandejas ven limitado su acceso al alimento y al estar confinadas en un espacio fijo el contacto es inevitable y mayor a media que crecen. Cuando el contacto físico ocurre, la ingestión de alimento puede ser inhibida por los individuos vecinos, o las valvas pueden sufrir algún daño, haciendo con que las ostras destinen más energía para su recuperación (Holliday *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1997a).

El peso total durante todo el cultivo presentó la misma tendencia vista para la longitud y anchura, con mayores valores en las densidades más bajas.

Como afirman varios autores (Askew, 1978; Spencer *et al.*, 1985; Holliday *et al.*, 1991; Holliday *et al.*, 1993), en una explotación comercial, la densidad de cultivo deberá estar basada en consideraciones económicas ya que aunque se obtengan mejores resultados de crecimiento individuales en ostras cultivadas a baja densidad, esto puede ser inviable financieramente por el bajo uso efectivo de las unidades de cultivo y la pérdida de espacio. Los resultados obtenidos el presente trabajo, apuntan un mayor crecimiento en longitud, anchura y peso en las densidades más bajas, sin embargo esta diferencia no es significativa en el crecimiento en longitud y anchura, lo que supone que cualquier una de las densidades evaluadas podría ser indicada como la densidad óptima de cultivo. De esta manera, un indicador que evalúa el cultivo desde el punto de vista económico es la producción total por unidad de cultivo, que contiene los datos de peso unitario de las ostras cultivadas y los datos de supervivencia, la cual durante todo el periodo fue superior en las densidades más elevadas.

Al analizar los datos de peso total por unidad de cultivo obtenidos en el presente estudio, se constata la viabilidad productiva del cultivo utilizando la densidad de 100 ostras/bandeja, dado que en la misma se alcanza el máximo de producción a los seis meses de cultivo. El efecto de la competencia por el alimento también pudo ser observado en el peso por unidad de cultivo, pues los máximos de producción se alcanzan antes en las densidades más bajas, con supervivencias semejantes.

Rheault y Rice (1995), apuntan en su trabajo que las bajas densidades de cultivo pueden eventualmente traducirse en menor competencia y mayores tasas de crecimiento. Sin embargo, este incremento viene dado a expensas de una mayor inversión en estructuras de cultivo y disponibilidad de espacio.

Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con los obtenidos por Iglesias *et al.* (2005), quienes estudiaron el cultivo de *C. gigas* en la misma área (Polígono A de O Grove), se comprueba que las ostras cultivadas a una densidad de 320 ostras/m² no alcanzan el peso comercial en 14 meses de cultivo. Sin embargo, en el presente estudio, para la densidad de 40 ostras/bandeja (= 400 ostras/m²) se alcanza la talla 3 del mercado francés (65-80g) a los 6 meses de cultivo y en 8 meses el caso de las densidades de 60, 80 y 100 ostras/bandeja (= 600, 800 y 1000 ostras/m² respectivamente). Estos resultados indican la idoneidad de las jaulas utilizadas en el presente estudio, una vez que las mismas pueden mantener una gran densidad produciéndose ostras de una talla comercial en un corto tiempo de cultivo.

Doménech (1990) cultivando *C. gigas* en la Ría de Villaviciosa (Asturias), con cestos ostrícolas de 40 cm de diámetro y 10 cm de altura, con densidades de 20, 40, 60 y 80 ostras/cesta, alcanzó la talla comercial del mercado francés después de 13 meses de cultivo para todas las densidades, con excepción de la densidad de 80 ostras/cesta, la cual no alcanzó la talla comercial hasta pasados 18 meses de cultivo. Comparando estos resultados, con los obtenidos en el presente trabajo, se podría afirmar que las ostras cultivadas a todas las densidades, incluso las más elevadas (80 y 100 ostras/bandeja), llegan a la talla comercial después de 8 meses de cultivo.

Por el contrario, Toro *et al.* (1995) cultivando *Ostrea chilensis* en pearl nets a densidades de 60, 90 y 120 ostras/cesta y DiSalvo y Martínez (1985) con 180 y 400 ostras/cesta en Chile no observan un efecto de la densidad de cultivo en longitud después de 24 y 18 meses de cultivo. Sin embargo Holliday *et al.* (1991, 1993) cultivando *Saccostrea commercialis* encontraron diferencias significantes para longitud y peso.

Diversos autores encontraron que cuando se analiza la supervivencia no hay relación entre esta y la densidad (Holliday *et al.*, 1991; Parsons y Dadswell, 1992; Côté *et al.*, 1993; Mgaya y Mercer, 1995; Hurley y Walker, 1996, Maeda-Martínez *et al.*, 1997). Estos resultados coinciden con lo obtenido en el presente trabajo, donde no hubo un patrón de disminución de la supervivencia con el aumento de las densidades de cultivo.

Un factor que puede haber influido en la supervivencia y no ha podido ser cuantificado en el presente trabajo, fue el efecto de los depredadores, ya que durante los muestreos se ha podido ver que los tratamientos con menor densidad normalmente presentaban mayor invasión por depredadores, principalmente cangrejos, debido a la facilidad de penetración en las jaulas y posibilidad de moverse dentro de las mismas.

Desde el punto de vista de la calidad de las ostras cultivadas, un factor que puede influir negativamente en la comercialización es la presencia de cámaras de gel, la cual normalmente se relaciona con la contaminación por tributilestaño (TBT) presente en las pinturas antiincrustantes que se aplican al casco de las embarcaciones (Alzieu *et al.*, 1982; Alzieu y Héral, 1984; Rodríguez y López, 1985; Héral *et al.*, 1989), sin embargo Héral *et al.* (1981), describen el periodo de aparición de las cámaras de gel como un fenómeno rápido y cíclico relacionado directamente con el verano. A través de nuestros resultados, no podemos descartar el posible efecto del TBT en la formación de las cámaras de gel, ya que la batea de cultivo está situada cerca del puerto de O Grove, donde hay un gran movimiento de embarcaciones, aunque, es evidente en nuestros datos que el aumento de las cámaras de gel coincide con la subida de la temperatura. Por otro lado, debido a la menor incidencia de cámaras de gel en las ostras cultivadas en las densidades más bajas también se puede plantear la hipótesis de que este fenómeno esté relacionado con la energía acumulada en la ostra, y que en los momentos de mayor utilización de energía para el crecimiento en concha y para la gametogénesis pueda “faltar” energía en las ostras cultivadas en densidades más elevadas haciendo que se produzca una malformación de la concha. En nuestro caso, ambos factores, incremento de la temperatura y gametogénesis, se superponen y coinciden con el aumento de la afectación por las cámaras de gel, que se produce a partir de abril o mayo y llega a sus valores máximos en finales de verano y principios de otoño. Igualmente su reducción durante el invierno coincide con la bajada de temperatura y un período de poca actividad gametogénica.

Con relación al mercado, el principal país consumidor de ostras en Europa es Francia, cuyo mercado está basado en su propia producción, que ha alcanzado más de 95 mil toneladas en 2010 (FAO, 2013). Sin embargo, su consumo es muy puntual, concentrándose las ventas en el mes de diciembre, particularmente durante las festividades de Navidad y Año Nuevo.

Las importaciones en Francia vienen incrementándose año tras año, e ya representan un valor promedio de 4000 toneladas, siendo importadas en un 60% de Irlanda.

En el mercado francés hay una subdivisión de las ostras por grupos de peso unitario, siendo las más apreciadas las de talla 3 (65-80g). Sin embargo, debido al bajo crecimiento de las ostras en Francia, los productores están consiguiendo vender principalmente ostras de la talla 4 (46-65g).

Analizando los datos de crecimiento en peso durante todo el cultivo, se ha podido establecer que las ostras cultivadas bajo la densidad de 40 ostras/bandeja alcanzan la talla 3 del

mercado francés en cinco meses de cultivo, pudiendo ser vendidas ya en septiembre de 2008. Sin embargo, el cultivo con densidades de 60, 80 y 100 ostras/bandeja alcanzan la talla 3 del mercado francés en diciembre de 2008. Por lo tanto, se puede concluir que todos las ostras cultivadas utilizando las jaulas a las diferentes densidades empleadas en el presente trabajo ya podrían ser comercializados antes del momento de mayor importación francesa, con un tiempo máximo de cultivo de 8 meses.

8.5. CONCLUSIONES

- El crecimiento en longitud, anchura y peso, durante la primera etapa del cultivo, ha estado directamente relacionado con las densidades utilizadas, produciéndose los mayores valores a las densidades más bajas.
- El índice de forma 1, que relaciona la anchura con la longitud, fue eficiente en la separación de las ostras con relación al umbral determinado.
- La densidad de 100 ostras/bandeja en jaula alcanzó la máxima producción a los seis meses de cultivo, verificando su viabilidad desde el punto de vista productivo.
- No hubo un patrón de disminución de la supervivencia con el aumento de las densidades de cultivo.
- La presencia de cámaras de gel puede estar relacionada con la energía acumulada en la ostra, haciendo con que en los momentos de mayor utilización de energía para el crecimiento en concha y para la gametogénesis pueda “faltar” energía en las ostras cultivadas en las densidades más elevadas produciéndose una malformación de la concha.
- Hay una relación directamente proporcional entre la temperatura, la gametogénesis y la formación de cámaras de gel.
- Todos las ostras cultivadas bajo las diferentes densidades empleadas en el presente trabajo podrían ser comercializados antes del momento de mayor importación francesa, con un tiempo máximo de cultivo de 8 meses.
- Las jaulas de cultivo probadas en este estudio, por la alta densidad de cultivo y el rápido crecimiento observado, demostraron una gran idoneidad para el cultivo de ostra.

9. CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal de esta tesis fue profundizar en el conocimiento científico de la biología de la ostra japonesa *C. gigas* cultivada en batea en Galicia, específicamente en la Ría de Arousa. Los capítulos presentes hacen un análisis de las características reproductivas, bioquímicas y de cultivo, evaluando además, el efecto del sistema de cultivo sobre estos parámetros. A continuación se exponen las principales conclusiones:

Capítulo 3. Biología reproductiva de la ostra japonesa en la Ría de Arousa

1. Las ostras cultivadas en la Ría de Arousa siempre están en proceso de gametogénesis no entrando en periodo de reposo sexual (estadio 0).
2. La temperatura y la clorofila *a* están directamente relacionadas con la maduración, pudiendo las ostras cultivadas en la Ría de Arousa madurar a temperaturas inferiores a los 14 °C.
3. La temperatura necesaria para la inducción a la puesta es distinta entre los sexos, siendo necesaria una temperatura superior a los 15 °C para la inducción en machos y 18 °C para la inducción en hembras.
4. Los machos presentan puestas parciales durante el período de mayo hasta diciembre con dos picos, uno en primavera y el otro en otoño, siendo el segundo pico más pronunciado, mientras las hembras presentan un período de puesta comprendido entre el mes de julio y octubre, con una única puesta masiva.
5. El primero pico de puesta está relacionado tanto con las temperaturas elevadas así como con las altas concentraciones de clorofila *a* presente en el medio, mientras el segundo pico de puesta de los machos en otoño, está relacionado principalmente con el alimento disponible en el medio.
6. El uso del IC como único medio de análisis del desarrollo gonadal lleva a conclusiones equivocadas con relación a las épocas de puesta siendo necesario el uso de la histología como complemento a los métodos cuantitativos y viceversa.

Capítulo 4. Composición bioquímica general de la ostra japonesa en la Ría de Arousa

7. La ostra japonesa *C. gigas* cultivada en la Ría de Arousa presenta un comportamiento conservativo en el primer ciclo gametogénico en machos y en hembras, mientras los

- machos presentan un comportamiento oportunista durante el segundo ciclo gametogénico en ambos años de estudio.
8. La evolución de los componentes bioquímicos en cantidad total (mg.ind^{-1}) no presenta diferencia significativa entre los sexos.
 9. Los machos presentan menor porcentaje de lípidos y mayor porcentaje de proteínas que las hembras, durante el ciclo gonadal.
 10. Las reservas de glucógeno acumuladas durante el otoño son movilizadas durante el invierno y primavera para sustentar la gametogénesis.
 11. Hay una relación inversa entre el contenido de glucógeno y el contenido de lípidos, de manera que la vitelogénesis se produce a expensas de las reservas de glucógeno almacenadas.
 12. La acumulación de los lípidos presenta una sincronía con la maduración sexual, alcanzando los máximos valores en los momentos de mayor maduración gonadal.
 13. El incremento de lípidos en hembras, después del periodo de puesta, puede estar relacionado con el proceso de acumulación de energía y su consumo durante el desarrollo somático.
 14. Las proteínas son los componentes bioquímicos mayoritarios dentro de la materia orgánica y su evolución en contenido total presenta una sincronía con el desarrollo de los ovocitos, alcanzando los valores máximos de diámetro ovocitario en los meses de máximos valores de proteínas.

Capítulo 5. Efecto del sistema de cultivo sobre la biología reproductiva de la ostra japonesa en la Ría de Arousa

15. El sistema de cultivo afecta directamente a la formación del sexo, produciéndose más machos en el sistema de jaulas y más hembras en cuerdas, confirmando la hipótesis del efecto de la disponibilidad de alimento en la definición del sexo en *C. gigas*.
16. El sistema de cultivo en jaulas afecta directamente a la obtención del alimento y su consecuente transformación en reservas y desarrollo de los gametos.
17. El sistema de jaulas, a diferencia del cultivo en cuerdas, plantea un ambiente con una fuerte competencia por el espacio y el alimento, que lleva aparejado un retraso en la gametogénesis y una mayor presencia de individuos indeterminados.
18. El cultivo en cuerdas, desde el punto de vista del desarrollo gonadal, es más eficiente, produciéndose ostras con valores superiores del índice de condición y del índice de ocupación gonadal, lo que conlleva respectivamente a individuos con más carne y más gametos.

19. El cultivo en jaulas en densidades elevadas limita la proliferación de la ostra japonesa en el área de cultivo durante los primeros años de vida.
20. Las hembras cultivadas en jaulas son las más afectadas por este sistema de cultivo, no llegando a madurar sus ovocitos y ocurriendo una posible reabsorción de los gametos.

Capítulo 6. Efecto del sistema de cultivo sobre la composición bioquímica de la ostra japonesa en la Ría de Arousa

21. El sistema de cultivo afecta a la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas.
22. Las ostras cultivadas bajo el sistema de jaulas presentan una menor eficiencia en la acumulación de las reservas bioquímicas.
23. Hay un efecto directo de la aglomeración sobre la acumulación y movilización de las reservas bioquímicas y su consecuente transformación durante la gametogénesis, con énfasis en la ovogénesis.
24. La competencia intraespecífica dentro de las jaulas y la formación del biofouling sobre las mallas externas son las principales causas para la menor eficiencia en la acumulación de las reservas bioquímicas en jaulas.
25. El sistema de cuerdas proporciona un mayor acumulo de materia orgánica y de todos los componentes bioquímicos principales.
26. Ostras cultivadas en cuerdas presentan energía suficiente para producir y madurar los gametos, así como mantener el acúmulo de las reservas bioquímicas.
27. Ostras cultivadas en jaulas acumulan proteínas como componente mayoritario de la materia orgánica, mientras ostras cultivadas en cuerdas acumulan tanto carbohidratos como proteínas.

Capítulo 7. Efecto del sistema de cultivo sobre el crecimiento de la ostra japonesa en la Ría de Arousa

28. El sistema de cultivo afecta al crecimiento de la ostra japonesa en la Ría de Arousa.
29. Durante todo el período de estudio las ostras cultivadas en cuerda presentan un incremento constante en longitud, anchura y peso, además de valores muy superiores de peso húmedo y seco de las partes blandas, y una menor afectación por cámaras de gel.
30. Las ostras cultivadas en jaulas presentan crecimiento significativo de los parámetros productivos durante los primeros cuatro meses de cultivo, lo que apunta la viabilidad de este sistema, durante este periodo, desde el punto de vista biológico y productivo.

31. El sistema de jaula empieza a notar el fenómeno de auto-raleo a partir del quinto mes de cultivo, con detención del crecimiento y aumento de la mortalidad, por lo que se recomienda una disminución de la densidad, con el fin de mantener el crecimiento de los parámetros productivos. Por otro lado, las ostras cultivadas en cuerdas no presentan el fenómeno de auto-raleo, como indica el crecimiento constante de los parámetros productivos y la baja mortalidad.
32. Las jaulas plantean un sistema menos favorable por la disminución de la circulación de agua debido principalmente a las incrustaciones externas en la malla, además de una mayor competencia por el alimento y espacio entre ostras, por lo que hay un menor crecimiento.
33. La diferente presencia de cámaras de gel en los sistemas de cuerda y jaula, inducen a plantear la importancia de la acumulación de energía en este tipo de proceso, y apuntarían a las restricciones energéticas en los momentos de mayor requerimiento energético para el crecimiento de concha y para la gametogénesis, como causa de la aparición de cámaras de gel en las ostras cultivadas en jaulas.

Capítulo 8. Efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento de la ostra japonesa en la Ría de Arousa

34. El crecimiento en longitud, anchura y peso, durante la primera etapa del cultivo, ha estado directamente relacionado con las densidades utilizadas, produciéndose los mayores valores a las densidades más bajas.
35. La densidad de 100 ostras/bandeja en jaula alcanzó la máxima producción a los seis meses de cultivo, verificando su viabilidad desde el punto de vista productivo.
36. No hubo un patrón de disminución de la supervivencia con el aumento de las densidades de cultivo.
37. La presencia de cámaras de gel puede estar relacionada con la energía acumulada en la ostra, haciendo con que en los momentos de mayor utilización de energía para el crecimiento en concha y para la gametogénesis pueda “faltar” energía en las ostras cultivadas en las densidades más elevadas produciéndose una malformación de la concha.
38. Todas las ostras cultivadas bajo las diferentes densidades empleadas en el presente trabajo podrían ser comercializadas antes del momento de mayor importación francesa, con un tiempo máximo de cultivo de 8 meses.
39. Las jaulas de cultivo probadas en este estudio, por la alta densidad de cultivo y el rápido crecimiento observado, demostraron una gran idoneidad para el cultivo de ostra.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaboshi, S., Pereira, O.M., Jacobsen, O., Yamanaka, N.** 1979. Fecundação e crescimento larval de ostra *Crassostrea gigas* em laboratório, Cananéia – SP. Boletim do Instituto de Pesca 9: 45–50.
- Akaboshi, S., Pereira, O.M., Sinque, C.** 1983. Experimental culture of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1773), in the estuarine lagoon region of Cananéia (25° 05'S; 48° 01'W) São Paulo, Brazil. Boletim do Instituto de Pesca 10: 1-8.
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Pérez-Camacho, A.** 2007. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. Comparative Biochemistry and Physiology 146B: 241-249.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.** 1994. Molecular Biology of the Cell (3rd edition). Ed. Garland Publishing. Nueva York. 1146 pp.
- Allen, W.V., Conley, H.** 1982. Transport of lipids in the blood of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Comparative Biochemistry and Physiology 71B: 201-207.
- Alunno-Bruscia, M., Petraitis, P.S., Bourget, E., Fréchette, M.** 2000. Body size-density relationship for *Mytilus edulis* in an experimental food-regulated situation. Oikos 90(1): 28–42.
- Alunno-Bruscia, M., Bourget, E., Fréchette, M.** 2001. Shell allometry and length-mass-density relationship for *Mytilus edulis* in an experimental food-regulated situation. Marine Ecology Progress Series 219: 177-188.
- Alzieu, C., Héral, M., Thibaud, Y., Dardignac, M.J., Feuillet, M.** 1982. Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huitre *Crassostrea gigas*. Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes 45(2): 101-116.
- Alzieu, C., Héral, M.** 1984. Ecotoxicological effects of organotin compounds on oyster culture. En: Ecotoxicological testing for the marine environment. Personne, G, Jaspers, E., Claus, C. (eds.). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res. Bredene. Belgium. vol. 2. 588 pp.
- Alzieu, C.L., Sanjuán, J., Deltreil, J.P., Borel, M.** 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. Marine Pollution Bulletin 17(11): 494-498.
- Askew, C.G.** 1978. A generalized growth and mortality model for assessing the economics of bivalve culture. Aquaculture 14: 91-104.
- Baghurst, B.C., Mitchell, J.G.** 2002. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture Research 33: 1253-1263.
- Barber, B.J., Blake, N.J.** 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 52: 121-134.

- Barber, B.J., Blake, N.J.** 1991. Reproductive Physiology. En: Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science vol. 21. Shumway, S.E. (ed.). Elsevier. Amsterdam. 177-191.
- Barber, B.J.** 1996. Gametogenesis of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1771), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease-endemic lower Chesapeake Bay. Journal of Shellfish Research 15(2): 285-290.
- Bayne, B.L.** 1975. Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. En: Physiological ecology of estuarine organism. Univ. South Carolina Press. Columbia. 259-277.
- Bayne, B.L.** 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. En: Estuarine Process. Wiley, M. (ed.). Academic Press. 432-448.
- Bayne, B.L., Bubel, A., Gabbott, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N.** 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). Marine Biology Letters 3: 89-105.
- Bayne, B.L., Newell, R.C.** 1983. Physiological energetics of marine mollusc. En: The Mollusca. Salenium, A.S.M., Wilbur, K.M. (eds.). Academic Press. Nueva York. 4(1): 407-515.
- Beltrán-Lugo, A.I., Maeda-Martínez, A.N., Pacheco-Aguilar, R., Nolasco-Soria, H.G.** 2006. Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). Aquaculture 258: 619-632.
- Beninger, P.G., Lucas, A.** 1984. Seasonal variations in condition, reproductivity activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* (Jeffrey, 1863) and *Tapes philiphinarum* (Adams and Reeve, 1850). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 79: 19-37.
- Bernard, F.R.** 1974. Annual biodeposition and gross energy budget of mature Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 31: 185-190.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M.** 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West-Coast of France). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 125: 359-369.
- Berthelin, C., Laisney, J., Espinosa, J., Martin, O., Hernandez, G., Mathieu, M., Kellner, K.** 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). Invertebrate Reproduction and Development 40(1): 79-86.
- Bodoy, A., Prou, J., Berthome, J.P.** 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'hôte creuse (*Crassostrea gigas*). Haliotis 15: 173-182.
- Boromthanasarat, S., Deslous-Paoli, J.M.** 1988. Production of *Mytilus edulis* L. reared on bouchots in the Bay of Marrenes-Oleron: comparison between two methods of culture. Aquaculture 72: 255-263.

- Borzone, C.A., Pezzuto, P.R., Garcia-Tavares, Y.A.** 2003. Características histológicas del ciclo reproductivo de *Euvola ziczac* (Linnaeus) (Pectinidae, Bivalvia) del litoral sur-sudeste del Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 763-772.
- Brake, J., Evans, F., Langdon, C.** 2003. Is beauty in the eye of the beholder? Development of a simple method to describe desirable shell shape for the pacific oyster industry. *Journal of Shellfish Research* 22(3): 767-771.
- Buroker, N.E.** 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23(2): 271-279.
- Cadavid, J.P.R.** 2008. Ciclo reproductor y anatomía funcional de la gónada de *Chamys varia* (Linnaeus, 1758). Tesis doctoral en Biología Marina y Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela. 334 pp.
- Cannuel, R., Beninger, P.G.** 2005. Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 18: 35-43.
- Carlucci, R., Sassaneli, G., Matarrese, A., Giove, A., D'Onghia, G.** 2010. Experimental data on growth, mortality and reproduction of *Ostrea edulis* (L., 1758) in a semi-enclosed basin of the Mediterranean Sea. *Aquaculture* 306: 167-176.
- Carroll, M.A., Catapane, E.J.** 2007. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148A: 445-450.
- Castaños, C., Pascual, M., Camacho, A.** 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern Patagonia, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 28(4): 837-847.
- Chávez-Villalba, J., Mingant, C., Cochard, J.C., Le Pennec, M.** 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30: 1-12.
- Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., Barret, J., Enríquez-Díaz, M., Cáceres-Martínez, C.** 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 22(3): 721-731.
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R., Cáceres-Martínez, C.** 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquaculture Research* 38: 268-278.
- Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A., Burrola-Sánchez, S., Hoyos-Chairez, F.** 2010. Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture* 300: 128-136.

- Chew, K.K.** 1986. Review of recent molluscan culture. En: Realism in aquaculture: achievements, constraints, perspectives. Bilio, M., Rosenthal, H., Sindermann, C.J. (eds.) 173-198.
- Chícharo, L., Chícharo, M.A.** 2001. Effects of environmental conditions on planktonic abundances, benthic recruitment and growth rates of the bivalve mollusc *Ruditapes decussatus* in a Portuguese coastal lagoon. *Fisheries Research* 53: 235-250.
- Choi, K.S., Lewis, D.H., Powell, E.N., Ray, S.M.** 2008. Quantitative measurements of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture Research* 24: 299–322.
- Choi, Y.H., Chang, Y.J.** 2003. Gametogenic cycle of the transplanted cultured pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* (Bivalvia: pteriidae) in Korea. *Aquaculture* 220: 781-790.
- Claereboudt, M., Bureau, D., Cote, J., Himmelman, J.H.** 1994. Fouling development and its effect on the growth of juvenile giant scallops (*Placopecten magellanicus*) in suspended culture. *Aquaculture* 121: 327–342.
- Côté, J., Himmelman, J.H., Claereboudt, M., Bonardelli, J.C.** 1993. Influence of density and depth on the growth of juvenile sea scallops (*Placopecten magellanicus*) in suspended culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 1857-1869.
- Crosby, M.P., Gale, L.D.** 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research* 9: 233-237.
- Cubillo, A.M.** 2012. Relaciones de competencia intra-específica y auto-raleo del mejillón *Mytilus galloprovincialis* en sistemas de cultivo suspendido. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. 140 pp.
- Cubillo, A.M., Peteiro, L.G., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U.** 2012a. Density-dependent effects on morphological plasticity of *Mytilus galloprovincialis* in suspended culture. *Aquaculture* 338-341: 246-252.
- Cubillo, A.M., Peteiro, L.G., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U.** 2012b. Influence of stocking density on growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in suspended culture. *Aquaculture* 342-343: 103-111.
- Darriba, S., San Juan, F., Guerra, A.** 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311: 101-115.
- da Silva, P.M., Fuentes, J., Villalba, A.** 2009. Differences in gametogenic cycle among strains of the European flat oyster *Ostrea edulis* and relationship between gametogenesis and bonamiosis. *Aquaculture* 287: 253-265.
- Delgado, M., Pérez Camacho, A.** 2003. A study of gonadal development in *Ruditapes decussatus* (L.) (MOLLUSCA, BIVALVIA), using image analysis techniques: influence of food ration and energy balance. *Journal of Shellfish Research* 22 (2): 435-441.

- Deslous-Paoli, J.M., Heral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J.** 1982. Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 45: 319-327.
- Deslous-Paoli, J.M.; Héral, M.** 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Olerón. *Aquatic Living Resources* 1: 239-249.
- Dinamani, P.** 1987. Gametogenic patterns in population of pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture* 64: 65-76.
- DiSalvo, L.H., Martínez, E.** 1985. Culture of *Ostrea chilensis* Philippi (1845) in a north central Chilean coastal bay. *Biología pesquera* 14: 16-22.
- Doménech, J.L.** 1990. Primeros datos sobre el crecimiento de la ostra, *Crassostrea gigas*, en la Ría de Villaviciosa (Asturias, Norte de España). *Actas del III Congreso Nacional de Acuicultura*, 515-520.
- Domínguez, M.J.B.** 2010. Influencia de la temperatura en el desarrollo gonadal y la movilización de reservas de la almeja fina (*Ruditapes decussatus* (L.)). Tesis doctoral en Biología Marina y Acuicultura. Universidad da Coruña. 274 pp.
- Dridi, S., Romdhane, M.S., Elcafsi, M.** 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263: 238-248.
- Drummond, L., Mulcahy, M., Culloty, S.** 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture* 254: 326-340.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Duinker, A.** 2002. Processes related to reproduction in great scallop (*Pecten maximus* L.) from Western Norway. Tesis Doctoral. Dep. of Fisheries and Mar. Biol. University of Bergen. Norway. 43pp + artículos.
- Eble, A.F., Scro, R.** 1996. General Anatomy. En: *The Eastern Oyster: Crassostrea virginica*. Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (eds.). Maryland Sea Grant College. Maryland. U.S.A. 19-73.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M.** 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International* 17(5): 491-506.
- Eyton, W.S.** 1958 *A history of the oyster and the oyster fisheries*. London: John Van Voorst, Paternoster Row. 46 pp.

- Fabioux, C.** 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosérie. Tesis doctoral en Oceanografía biológica. Université de Bretagne Occidentale. 199 pp.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S.** 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* internal clock. *Aquaculture* 250: 458-470.
- FAO.** 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, Italy. 197 pp.
- FAO.** 2013a. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus: Universal Software For Fishery Statistical Time Series. Version 2.3.
- FAO.** 2013b. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. [15 de Julio de 2013].
- Fernández, P.P., Parra, A.M., Serrano, S.J.** 2002. Búsqueda de marcadores de madurez de los gametos durante el ciclo gametogénico de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 165-173.
- Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Babarro, J.M.F.** 1996. Comparative allometries in growth and chemical composition of mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk.) cultured in two zones in the Ría de Sada (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Research* 15(2): 349-353.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Delgado, M., Labarta, U.** 2007. Dynamics of biochemical components, lipid classes and energy values on gonadal development of *R. philippinarum* associated with the temperature and ingestion rate. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147(4):1053-1059.
- Filgueira, R., Peteiro, L.G., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J.** 2008. The self-thinning rule applied to cultured populations in aggregate growth matrices. *Journal of Molluscan Studies* 74: 415-418.
- Fréchette, M., Bourget, E.** 1985. Food-limited growth of *Mytilus edulis* L. in relation to the benthic boundary layer. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 1166-1170.
- Fréchette, M., Lefaivre, D.** 1990. Discriminating between food and space limitation in benthic suspension feeders using self-thinning relationships. *Marine Ecology Progress Series* 65(1): 15-23.
- Fréchette, M., Aitken, A.E., Pagé, L.** 1992. Interdependence of food and space limitation of a benthic suspension feeder: consequences for self-thinning relationships. *Marine Ecology Progress Series* 83: 55-62.
- Fréchette, M., Lefaivre, D.** 1995. On self-thinning in animals. *Oikos* 73: 425-428.
- Fréchette, M., Bergeron, P., Gagnon, P.** 1996. On the use of self-thinning relationships in stocking experiments. *Aquaculture* 145: 91-112.
- Fuentes, J., Gregorio, V., Giráldez, R., Molaes, J.** 2000. Within-raft variability of the growth rate of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, cultivated in the Ría de Arousa (NW Spain). *Aquaculture* 189: 39-52.

- Gabbott, P.A., Bayne, B.L.** 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 53: 269-286.
- Gabbott, P.A.** 1975. Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. En: Proceedings of 9th European Marine Biology Symposium (Barnes, H. ed.). Aberdeen University Press. 191-211.
- Gabbott, P. A.** 1976. Energy metabolism. En: Marine mussels: Their ecology and physiology. Bayne, B.L. (ed.). Cambridge University Press. Cambridge. 293-355.
- Gabbott, P.A.** 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine mollusks. En: The Mollusca 2: environmental biochemistry and physiology. Hochachka, P.W. (ed.). New York: Academic Press. 165–217.
- Galtsoff, P.S.** 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. Vol. 64. 456 pp.
- Galvão, M.S.N., Pereira, O.M., Machado, I.C., Henriques, M.B.** 2000. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliensis* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25°S, 48°W). Boletim do Instituto de Pesca 26(2): 147-162.
- Gascoigne, J.C., Beadman, H.A., Saurell, C., Kaiser, M.J.** 2005. Density dependence, spatial scale and patterning in sessile biota. Oecologia 145: 371-381.
- Giese, A.C.** 1959. Comparative physiology: Annual reproductive cycles of marine invertebrates. Annual Review of Physiology 21: 547-576.
- Giese, A.C., Pearse, J.S.** 1974. Introduction: General principles. En: Reproduction of Marine Invertebrates. Vol I. Acoelomate and pseudocoelomate Metazoans. Giese, A.C., Pearse, J.S. (eds.). Academic press. Nueva York. 3-49.
- Giese, A.C., Kanatani, H.** 1987. Maturation and spawning. En: Reproduction of marine invertebrates. Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B. (eds.). Blackwell- Boxwood. Boston (4): 251-330.
- Grant, A., Tyler, P.A.** 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction: I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. International Journal of Invertebrate Reproduction 6: 259-269.
- Grant, J., Emerson, C.W., Mallet, A., Carver, C.** 2003. Growth advantages of ear hanging compared to cage culture for sea scallops, *Placopecten magellanicus*. Aquaculture 217: 301-323.
- Guerra, A., Acosta, C., Espinos, F.** 1987. Primeras experiencias de cultivo de la almeja japonesa (*Tapes semidecussatus*) y ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) en la Ría de Ribadeo (NW de España). Cuadernos Marisqueros, Publicación Técnica 12: 347-352.
- Guerra, A., Mosquera, G. Alvarez, M.J., Montes, J.** 1995. Crecimiento de semilla de ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) hasta talla comercial, cultivada en suspendido en diferentes zonas

de Galicia (NO España). Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura, Barcelona, España, 270-275.

Guiñez, R., Castilla, J.C. 1999. A tridimensional self-thinning model for multilayered intertidal mussels. *The American Naturalist* 154: 341–357.

Guiñez, R. 2005. A review of self-thinning in mussels. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40: 1–6.

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K.Jr. 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52: 394-402.

Hadley, N.H., Manzi, J.J. 1984. Growth of seed clams, *Mercenaria mercenaria*, at various densities in a commercial scale nursery system. *Aquaculture* 36: 369-378.

Harvey, M., Vincent, B. 1991. Spatial variability of length-specific production in shell, somatic tissue and sexual products of *Macoma balthica* in the lower St. Lawrence estuary: I. Small and mesoscale variability. *Marine Ecology Progress Series* 75: 55-66.

Hendriks, R.E., Van Duren, L.A., Herman, P.M.J. 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296: 199–213.

Héral, M., Berthome, J.P., Polanco Torres, E., Alzieu, C., Deslous-Paoli, J.M., Razet, D., Garnier, J. 1981. Anomalies de croissance de la coquille de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes -Oléron. Bilan de trois années d'observation. Council Meeting of the International Council for the Exploration of the Sea. (Woods Hole, MA (USA)). 1-16.

Héral, M., Alzieu, C., Deslous-Paoli, J.M. 1989. Effect of organotin compounds (TBT) used in antifouling paints on cultured marine molluscs – a literature study. En: *Aquaculture - a biotechnology in progress*. DePauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (eds.) European Aquaculture Society. Bredene. Belgium. 1081- 1089.

Holland, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochemical and Biophysical Perspectives of Marine Biology* 3: 85–123.

Holliday, J.E., Maguire, G.B., Nell, J.A. 1991. Optimum stocking density for nursery culture of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Aquaculture* 96: 7-16.

Holliday, J.E., Allan, G.L., Nell, J.A. 1993. Effects of stocking density on juvenile Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), in cylinders. *Aquaculture* 109: 13-26.

Hughes-Games, W.L. 1977. Growing the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in subtropical sea water fish ponds: I. Growth rate, survival and quality index. *Aquaculture* 11: 223-231.

Hughes, R.N., Griffiths, C.L. 1988. Self-thinning in barnacles and mussels: the geometry of packing. *The American Naturalist* 132: 484–491.

- Hummel, H., De Wolf, L., Zurburg, W., Apon, L., Bogaards, R.H., Van Ruitenburch, M.** 1989. The glycogen content in stressed marine bivalves: the initial absence of a decrease. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94B(4): 729–733.
- Hurley, D.H., Walker, R.L.** 1996. The effects of larval stocking density on growth and survival of laboratory reared *Spisula solidissima similis*. *Journal of Shellfish Research* 15: 527.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P.** 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304: 95-99.
- Iglesias, D., Rodríguez, L., Montes, J., Conchas, R.F., Pérez, J.L., Fernández, M., Guerra, A.** 2005. Estudio de la viabilidad del cultivo de ostra rizada *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en diferentes rías gallegas. Primeros resultados biológico-productivos. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21(1-4): 293-309.
- Iversen, E.S.** 1971. *Cultivos Marinos – Peces, Moluscos y Crustáceos*. Editorial Acribia.
- Jarayabhand, P.** 1988. The effects of age, size and stocking density on survival and growth of *Ostrea edulis*. *Journal of Shellfish Research* 7: 164-165.
- Jeffs, A., Dunphy, B.J., Wells, R.M.G.** 2002. Experimental effects of water temperature on the gametogenic development of broodstock in the oyster, *Ostrea chilensis*. *Journal of Shellfish Research* 21(2): 743-747.
- Joaquim, S., Matias, D., Lopes, B., Arnold, W.S., Gaspar, M.B.** 2008. The reproductive cycle of white clam *Spisula solida* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild stock management. *Aquaculture* 281: 43-48.
- Joaquim S., Matias D., Ramos M., Moura P., Arnold W., Chícharo L., Gaspar M.** 2011. Seasonal variations in reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gremlin, 1791) from Ria de Aveiro (northwestern coast of Portugal). *Scientia Marina* 75(2): 217-226.
- Jørgensen, C.B.** 1990. Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series* 142: 287-302.
- Kang, Ch-K., Park, M.S., Lee, P. Y., Choi, W.J., Lee, W.C.** 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *Journal of Shellfish Research* 19(2): 771-778.
- Kang, D-H., Hyun, C-Y., Limpanont, Y., Choi, K-S.** 2007. Annual gametogenesis of the Chinese anapella clam *Coecella chinensis* (Deshayes 1855) at an upper intertidal sandy beach on the east coast of Jeju, Korea. *Journal of Shellfish Research* 26(2): 433-441.
- Kanti, A., Heffernan, P., Walker, R.** 1993. Gametogenic cycle of the southern surfclam, *Spisula solidissima similis* (Say, 1822) from St. Catherines Sound, Georgia. *Journal of Fisheries Research* 12: 255-261.

- Kautsky, N.** 1982. Quantitative studies on gonad cycle, fecundity, reproductive output and recruitment in a baltic *Mytilus edulis* population. *Marine Biology* 68: 143-160.
- Kennedy, A.V., Battle, H.I.** 1964. Cyclic changes in the gonad of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 42: 305-321.
- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F.** 1996. The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College. Maryland. 733 pp.
- Ketata, I., Guermazi, F., Rebai, T., Hamza-Chaffai, A.** 2007. Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: A one year study in the gulf of Gabès area. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147A: 424-431.
- Kirk, R.G.** 1979. Marine Fish and Shellfish in the Member States of the European Economic Community. *Aquaculture* 16: 95-122.
- Kuwasawa, K., Hill, R.B.** 1997. Evidence for cholinergic inhibitory and serotonergic excitatory neuromuscular transmission in the heart of bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Experimental Biology* 200: 2123-2135.
- Lachance-Bernard, M., Himmelman, J.H., Daigle, G., Fréchette, M.** 2010. Biomass-density relationships and self-thinning of blue mussels (*Mytilus* spp.) reared on self-regulated long lines. *Aquaculture* 308: 34-43.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M.** 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190: 183-199.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M.** 2006. Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebrate Reproduction and Development* 49: 41-50.
- Larretxea, X.** 1995. Estudios de crecimiento en *Cerastoderma edule* (L.) (Bivalvia, Cardiidae): Bases fisiológicas de la producción individual. Tesis doctoral. Universidad País Vasco. 185pp.
- Lauzon-Guay, J.S., Hamilton, D.J., Barbeau, M.A.** 2005. Effect of mussel density and size on the morphology of blue mussels (*Mytilus edulis*) grown in suspended culture in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture* 249(1-4): 265-274.
- Lee, R.F., Heffernan, P.B.** 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and northern quahogs *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *Journal of Shellfish Research* 10: 203-206.
- Lenz, T., Boehs, G.** 2011. Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. *Revista de Biología Tropical* 59(1): 137-149.
- Li, Q., Osada, M., Mori, K.** 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science* 66: 502-508.

- Li, Y., Qin, J.G., Li, X., Benkendorff, K.** 2009. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* 286: 64–71.
- Linehan, L.G., O'Connor, T.P., Burnell, G.** 1999. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry* 64: 211–214.
- Liu, W., Alabi, A.O., Pearce, C.M.** 2008. Broodstock conditioning in the basket cockle. *Clinocardium nuttallii*. *Journal of Shellfish Research* 27: 399–404.
- Liu, W., Li, Q., Yuan, Y., Zhang, S.** 2008. Seasonal variations on reproductive activity and biochemical composition of the cockle *Fulvia mutica* (Reeve) from the eastern coast of China. *Journal of Shellfish Research* 27(2): 405-411.
- Loosanoff, V.L.** 1948. Gonad development and spawning of oyster (*O. virginica*) in low salinities. *The Anatomical Record* 101(4): 705.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C.** 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. *The Biological Bulletin* 98: 60–65.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Bayne, B.L.** 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 62: 133-145.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Lubet, P.** 1959. Recherches sur le cycle sexual et l'émission des gamètes chez le Mytilides et les Pectinides (mollusques bivalves). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 23: 387-548.
- Lubet, P.** 1976. Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamelibranches. *Haliotis* 7: 49-55.
- Lubet, P., Mann, R.** 1987. Les différentes modalités de la reproduction chez les mollusques bivalves. *Haliotis* 16: 181-195.
- Lubet, P.** 1994. Données récentes sur la biologie des mollusques. *Haliotis* 23: 3-14.
- Lubet, P., Mathieu, M.** 1999. Applications à la conchyliculture des récentes la biologie des mollusques bivalves. *Année Biologique* 38: 27-50.
- Lucas, A.** 1982. La nutrition des larves de bivalves. *Océanis* 8: 363– 388.
- Lucas, A., Beninger, P.G.** 1985. The use of physiological condition index in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44: 187-200.
- Maccachero, G.B., Ferreira, J.F., Guzinski, J.** 2007. Influence of stocking density and culture management of the mangrove native oyster *Crassostrea* sp. in southern Brazil. *Biotemas* 20(3): 47-53.

- Mackie, G.L.** 1984. Bivalves. En: The Mollusca. Vol. 7. Wilbur, K.M. (ed.). Academic press. Nueva York. 351-418.
- MacDonald, B.A., Thompson, R.J.** 1988. Intraspecific variation in growth and reproduction in latitudinally differentiated populations of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). The Biological Bulletin 175: 361-371.
- MacDonald, B.A., Bricelj, V.M., Shumway, S.E.** 2006. Physiology: Energy Acquisition and Utilization. En: Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Shumway, S.E., Parsons, G.J. (eds.). Elsevier. Amsterdam. 417-492.
- Maeda-Martínez, A.N., Reynoso-Granados, T., Monsalvo-Spencer, P., Sicard, M. T., Mazón-Suástegui, J.M., Hernández, O., Segocia, E., Morales, R.** 1997. Suspension culture of catarina scallop *Argopecten ventricosus* (=circularis) (Sowerby II, 1842), in Bahia Magdalena, México, at different densities. Aquaculture 158: 235-246.
- Mallet, A.L., Carver, C.E., Doiron, S., Thériault, M.H.** 2013. Growth performance of Eastern oysters *Crassostrea virginica* in Atlantic Canada: Effect of the culture gear. Aquaculture 396-399: 1-7.
- Mann, R.** 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 59: 95-110.
- Marquet, P.A., Navarrete, S.A., Castilla, J.C.** 1990. Scaling population-density to body size in rocky intertidal communities. Science 250(4984): 1125-1127.
- Martínez, G., Garrote, C., Mettifogo, L., Pérez, H., Uribe, E.** 1996. Monoamines and prostaglandin E2 as inducers of the spawning of the scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck. Journal of Shellfish Research 15: 245-249.
- Martínez, G., Mettifogo, L., Lenoir, R., Olivares, A.** 2000. Prostaglandins and reproduction of the scallop *Argopecten purpuratus*: II. Relationship with gamete release. Journal of Experimental Zoology 287:86-91.
- Mason, C.J., Nell, J.A.** 1995. Condition index and chemical composition of meats of Sydney Rock oysters (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) at four sites in Port Stephens, NSW. Marine and Freshwater Research 46: 873-881.
- Massapina, C., Joaquim, S., Matias, D., Devauchelle, N.** 1999. Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. Aquatic Living Resources 12(5): 327-333.
- Masseau, I., Bannon, P., Anctil, M., Dubé, F.** 2002. Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. The Biological Bulletin 202: 23-33.
- Mathieu, M., Lubet, P.** 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves – a brief review. Invertebrate Reproduction and Development 23: 123-129.

- Matsutani, T.** 1990. Endogenous factors controlling spawning in marine bivalves. En: Advances in Invertebrate Reproduction Vol. 5. Hoshi, M., Yamashita, O. (eds.). Elsevier Science. Amsterdam. 231-237.
- Maurer, D., Borel, M.** 1986. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15: 125-134.
- Menegueti, F., Moschino, V., Da Ros, L.** 2004. Gametogenic cycle and variations in oocytes size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 240: 473-488.
- Mgaya, Y.D., Mercer, J.P.** 1995. The effects of size grading and stocking density on growth performance of juvenile abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. *Aquaculture* 136: 297-312.
- Milione, M., Southgate, P.** 2011. Environmental conditions and culture method effects on growth and survival of juvenile winged pearl oyster, *Pteria penguin*. *Journal of Shellfish Research* 30(2): 223-229.
- Milne, P.H.** 1972. Fish and Shellfish Farming in Coastal Waters. Oxford. 208 pp.
- Miyamoto, H., Hamaguchi, M., Okoshi, K.** 2002. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Science* 68: 651-658.
- Montes, J., Mourelle, S.C., Melendez, M.I.** 1990. Bonamiosis en poblaciones de ostra plana (*Ostrea edulis*) de diferentes orígenes cultivada en Galicia. Actas del III Congreso Nacional de Acuicultura. Santiago de Compostela. 879-884.
- Mori, K.** 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 53: 361-369.
- Mouland, N., Parsons, G.J.** 1999. Influence of simulated fouling on current velocities in pearl nets. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 99(4): 49-51.
- Muranaka, M.S., Lannan, J.E.** 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39: 217-228.
- Naimi, A.** 2009. Le déterminisme du sexe de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours de son développement et du cycle gamétogénétique adulte: recherche de déterminants moléculaires. Tesis doctoral en Fisiología, biología de organismos, poblaciones e interacciones. Université de Caen Basse-Normandie. 212 pp.
- Nascimento, I.A.** 1978. Reprodução da ostra de mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828): um subsídio ao cultivo. Tesis Doctoral. Universidade de São Paulo. Brasil.
- Navarro, E., Iglesias, J.I.P., Larrañaga, A.** 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca estuary (Biscay, North Spain). *Marine Biology* 101: 503-511.
- Neveux, J., Panouse, M.** 1987. Spectrofluometric determination of chlorophylls and phaeophytins. *Archives of Hydrobiology* 109: 567-581.
- Newell, C.R.** 1990. The effect of mussel (*Mytilus edulis*, Linnaeus, 1758) position in seeded bottom patches on growth at subtidal lease in Maine. *Journal of Shellfish Research* 9: 113-118.

- Normand, J., Le Pennec, M., Boudry, P.** 2008. Comparative study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture* 282: 124-129.
- Okumus, I., Stirling, H.P.** 1998. Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture* 159: 249-261.
- Osada, M., Matsutani, T., Nomura, T.** 1987. Implication of catecholamines during spawning in marine bivalves molluscs. *Invertebrate Reproduction and Development* 12: 241-252.
- Osada, M., Nomura, T.** 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Prostaglandins* 40: 229-239.
- Paixão, L., Ferreira, M.A., Nunes, Z., Fonseca-Sizo, F., Rocha, R.** 2013. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. *Aquaculture* 380-383: 6-12.
- Pardellas, X., Polanco, E.** 1987. *Acuicultura Marina en Galicia*. Ed. Xerais, Vigo, 165 pp.
- Parra, A., García, O., San Juan, F.** 2005. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) in relation to gametogenic cycle. *Journal of Shellfish Research* 24: 457-467.
- Parsons, G.J., Dadswell, M.J.** 1992. Effect of stocking density on growth, production and survival of the giant scallop, *Placopcten magellanicus*, held in intermediate culture in Passamaquoddy Bay, New Brunswick. *Aquaculture* 103: 291-309.
- Pazos, A.J., Ruíz, C., García-Martín, O., Abad, M., Sánchez, J.L.** 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114B(2): 171-179.
- Pazos, A. J., G. Román, C.P. Acosta, Abad, M., Sánchez, J.L.** 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N. W. Spain) in relation to environmental conditions *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 211: 169-193.
- Pérez-Camacho, A., Román, G., Torre, M.** 1973. Posibilidades de los cultivos marinos en España. *Publicaciones Técnicas de la Dirección General de Pesca Marítima* 10: 297-314.
- Pérez Camacho, A., Román, G.** 1985. Cultivo en batea de semilla de ostra (*Ostrea edulis*) en la Ría de Arosa. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 2(2): 1-8.
- Pérez-Camacho, A., Delgado, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U.** 2003. Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Ecology Progress Series* 258: 133-145.
- Pertraitis, P.S.** 1995. The role of growth in maintaining spatial dominance by mussels (*Mytilus edulis*). *Ecology* 76: 1337-1346.

- Peterson, C.H.** 1982. The importance of predation and intra and interspecific competition in the population biology of two infaunal suspension feeding bivalves, *Protothaca staminea* and *Chione undatella*. *Ecological Monographs* 52: 437-475.
- Peterson, C.H., Black, R.** 1987. Resource depletion by active suspension feeders on tidal flats: influence of local density and tidal level. *Limnology and Oceanography* 32: 143-166.
- Peterson, C.H., Beal, B.F.** 1989. Bivalve growth and higher-order interactions—importance of density, site, and time. *Ecology* 70(5): 1390–1404.
- Pipe, R.K.** 1987. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Marine Biology* 95: 405–414.
- Pogoda, B., Buck, B.H., Saborowski, R., Hagen, W.** 2013. Biochemical and elemental composition of the offshore-cultivated oysters *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 400: 53-60.
- Quayle, D.B.** 1969. Pacific oyster culture in British Columbia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 169: 1-192.
- Raz, E.** 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell. *Genome Biology* 1(3): 1-6.
- Ren, J.S., Marsden, I.D., Ross, A.H., Schiel, D.R.** 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 171-182.
- Rheault, R.B., Rice, M.A.** 1995. Transient gear shellfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(1): 26-31.
- Robert, R., Borel, M., Pichot, Y., Trut, G.** 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resources* 4: 265-274
- Robinson, A.** 1992a. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106: 89-97.
- Robinson, A.** 1992b. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg). I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *Journal of Shellfish Research* 11: 437-441.
- Robinson, A.** 1992c. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg): II Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *Journal of Shellfish Research* 11: 443-447.
- Rodriguez, C.R., López, F.C.** 1985. Formation de chambres dans la coquille de h’uithe plate *Ostrea edulis* L. Cultivée dans les Rias de Galice. *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes* 47(1-2): 89-98.

- Román, G., Louro, A., de la Roche, J.P.** 2003. Intermediate culture of the king scallop (*Pecten maximus*) in suspension cages: Effect of stocking density and depth. *Journal of Shellfish Research* 22(3): 647-654.
- Royer, J., Ropert, M., Costil, K.** 2007. Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Normandy (France). *Journal of Shellfish Research* 26(4): 973-984.
- Royer, J., Seguineau, C., Park, K.I., Pouvreau, S., Choi, K.S., Costil, K.** 2008. Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277: 313-320.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O., Sánchez López, J.L.** 1992a. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155: 249-262.
- Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M., Sánchez, J.L.** 1992b. Seasonal variations in condition and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Marine Biology* 112: 67-74.
- Saout, C., Quere, C., Donval, A., Paulet, Y.M., Samain, J.F.** 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* L. from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172(3-4): 301-314.
- Sastry, A.N.** 1968. The relationship among food, temperature, and gonad development of the bay scallop *Aequipecten irradians* (Lamarck). *Physiological Zoology* 41: 44-53.
- Sastry, A.N.** 1970. Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the Bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *The Biological Bulletin* 138: 56-65.
- Sastry, A.N.** 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: *Reproduction of Marine Invertebrates, Molluscs: Pelecypods and lesser classes*. Giese, A.C., Pearse, J.S. (eds.). Academic Press. Nueva York. 113-292.
- Siniscalchi, A., Cavallini, S., Sonetti, D., Sbrenna, G., Capuano, S., Barbin, L., Turrolla, E., Rossi, R.** 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Marine Biology* 144: 1205-1212.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P.** 1997. Écophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquatic Living Resources* 10: 177-185.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H., Samain, J.F.** 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 121A: 279-288.

- Southgate, P.C., Beer, A.C.** 2000. Growth of blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) juveniles using different nursery techniques. *Aquaculture* 187: 97-104.
- Spencer, B.E., Gough, C.J., Thomas, M.J.** 1985. A strategy for growing hatchery-reared Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) to market size: experiments and observations on costed small-scale trials. *Aquaculture* 50: 175-192.
- Steele, S., Mulcahy, M.F.** 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79: 673-686.
- Suzuki, T., Hara, A., Yamaguchi, K., Mori, K.** 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 113: 239-245.
- Tanabe, T., Osada, M., Kyozuka, K., Inaba, K., Kijima, A.** 2006. A novel oocyte maturation arresting factor in the central nervous system of scallops inhibits serotonin-induced oocyte maturation and spawning of bivalve mollusks. *General and Comparative Endocrinology* 147:352-361.
- Taylor, J.J., Rose, R.A., Southgate, P.C., Taylor, C.E.** 1997a. Effects of stocking density on the growth and survival of early juvenile silver-lip pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson), held in suspended nursery culture. *Aquaculture* 153: 41-49.
- Taylor, J.J., Rose, R.A., Southgate, P.C.** 1997b. Effects of stocking density on growth and survival of juvenile silver-lip pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson), in suspended and bottom culture. *Journal of Shellfish Research* 16: 569-572.
- Thompson, R.J.** 1984. The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel *Mytilus edulis* in a subarctic, non-estuarine environment. *Marine Biology* 79: 277-288.
- Thompson, J.R., Newell, R.I.E., Kennedy, V.S., Mann, R.** 1996. Reproductive processes and early development. En: *The Eastern oyster Crassostrea virginica*. Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (eds.). Maryland Sea Grant. Maryland. USA. 335-370.
- Toro, J.E., Sanhueza, M.A., Winter, J.E., Senn, C.M., Aguila, P., Vergara, A.M.** 1995. Environmental effects on the growth of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* in five mariculture locations in the Chiloé Island, Southern Chile. *Aquaculture* 136:153-164.
- Torres, E.P., Corral, M.L.** 2001. La ostricultura en el Mundo. En: *Impulso, Desarrollo y Potenciación de la Ostricultura en España*. Ed. Fundación Alfonso Martín Escudero, Madrid, España. 17-22.
- Uriarte, I., Farías, A., Hernandez, J., Schäfer, C., Sorgeloos, P.** 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture* 230: 349-357.
- Vincent, B., Joly, D., Harvey, M.** 1994. Spatial variation in growth of the bivalve *Macoma balthica* (L.) on a tidal flat: effects of environmental factors and intraspecific competition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 181: 223-238.

- Wallace, J.C., Reisnes, T.G.** 1985. The significance of various environmental parameters for growth of the Iceland scallop, *Chlamys islandica* (Pectinidae) in hanging culture. *Aquaculture* 44: 229–242.
- Walne, P.R., Mann, R.** 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. En: Ninth European Marine Biology Symposium. Barnes, H. (ed.). Aberdeen University Press. Scotland. 587-607
- Ward, J.E., Newell, R.I.E., Thompson, R.J., MacDonald, B.A.** 1994. In vivo studies of suspension-feeding processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *The Biological Bulletin* 186: 221-240.
- Weiss, M.B., Carrant, P.B., Peterson, B.J., Gobler, C.J.** 2007. The influence of plankton composition and water quality on hard clam (*Mercenaria mercenaria* L.) populations across Long Island's south shore lagoon estuaries (New York, USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 345: 12-25.
- Westoby, M.** 1984. The self-thinning rule. *Advance Ecological Research* 14: 167–225.
- Wheatley, W.B.** 1951. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. *American Journal of Clinical Pathology* 21: 990–991.
- Whyte, J.N.C., Englar, J.R., Carswell, B.L.** 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture* 90: 157–172.
- Williams, J.R., Babcock, R.C.** 2004. Comparison of multiple techniques to evaluate reproductive variability in a marine bivalve: application to the scallop *Pecten novaezelandiae*. *Marine and Freshwater Research* 55: 457-468.
- Wylie, C.** 1999. Germ cells. *Cell* 96: 165-174.
- Xie, Q., Burnell, G.M.** 1994. A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (A. Adams & Reeve 1850) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coast of Ireland. *Journal of Shellfish Research* 13(2): 467-472.
- Xunta de Galicia.** 1992. Plan de Ordenación dos Recursos Pesqueiros e Marisqueiros de Galicia. (Serie Estadística de Pesca) Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura de la Xunta de Galicia. Santiago de Compostela (A Coruña). España. 1-52.
- Yakovlev, Y.M.** 1977. Reproductive cycle of the Pacific oyster in the sea of Japan. *Biologiya Morya* 3: 85-87.
- Zöllner, N., Kirsch, K.** 1962. Über die quantitative bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphanilin-Reaktion. *Z. Ges. Exp. Med.* 135: 545- 561.

