



Desarrollo de Protocolos de Manejo para la Inducción al Desove y Larvicultura de la Ostra Nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854)

A. Loor-Mera ⁽¹⁾, W. Arguello-Guevara ⁽²⁾

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos naturales ⁽¹⁾
Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” CENAIM ⁽²⁾
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
alfgloor@espol.edu.ec ⁽¹⁾, warguell@cenaime.spol.edu.ec ⁽²⁾

Resumen

Se acondicionaron reproductores de *Crassostrea iridescens* en tres ambientes, a “28°C”, “22°C” y en el reservorio de la Estación Experimental CENAIM-ESPOL, a 24,46±2,09°C “Reservorio”. El acondicionamiento 28°C fue el único que alcanzó etapas avanzadas de desarrollo gonadal. Se aplicaron siete estímulos externos para inducción al desove: cambios en la temperatura cada 60 minutos (T60'), y cada 30 minutos (T30'), incremento de temperatura y desecación (TAD), disminución (Smenos) e incremento (Smas) de la salinidad, sobrealimentación (SobA) y adición de espermatozoides (Esp). Una hora después del último estímulo, se adicionó espermatozoides. Se determinó el porcentaje de desove, tiempo de respuesta, producción de óvulos y porcentaje de fertilización. Con el acondicionamiento 28°C se obtuvo el mayor porcentaje de desoves (51,79%) a diferencia de 22°C (5,36%) y Reservorio (0%). El análisis de las variables evaluadas se lo realizó con los resultados obtenidos por el acondicionamiento 28°C. TAD registró el 100% de organismos desovados y con menor tiempo promedio de respuesta (1,40±1,01 h). La producción de óvulos y el porcentaje de fertilización fueron en promedio 34,88±23,81x10⁶ y 89,82±5,90%, respectivamente. Finalmente se describe el desarrollo embrionario y larvario de esta especie que registró una tasa de crecimiento de 7,21 μm.día⁻¹ y supervivencia 1% (día 22).

Palabras claves: *Crassostrea iridescens*, reproductores, acondicionamiento, inducción al desove, larvicultura.

Abstract

Broodstock of *Crassostrea iridescens* were conditioned in three environments, “28°C”, “22°C”, and in the reservoir of Estación Experimental CENAIM-ESPOL at 24,46±2.09°C (Reservorio). The conditioning “28°C” was the only one who reached advanced stages of gonadal development. Seven external stimuli were applied to induce spawning: changes in temperature every 60 minutes (T60'), and every 30 minutes (T30'), increased temperature and desiccation (TAD), decreased (Smenos) and increased (Smas) water salinity, overfeeding (SobA) and addition of sperm (Esp). Sperm were added an hour after the last stimulus. We determined the percentage of spawning, response time, egg production and fertilization rate. The conditioning “28°C” obtained the highest percentage of spawning (51.79%) as opposed to “22°C” (5.36%) and “Reservorio” (0%). The analysis of the variables evaluated was performed with the results of the conditioning “28°C”. TAD recorded 100% of broodstock spawned with lower average response time (1.40±1.01 h). Egg production and fertilization rate were on average 34,88±23,81x10⁶ and 89,82±5,90%, respectively. Finally, we describe the embryonic and larval development of this oyster which recorded a growth rate of 7.21 μm.day⁻¹ and survival of 1% (day 22).

Keywords: *Crassostrea iridescens*, broodstock, conditioning, spawning induction, larviculture

1. Introducción

El ostión de roca, *Crassostrea iridescens*, es un molusco bivalvo que se encuentra distribuido desde el sur de Baja California hasta el norte del Perú [1]. Registros indican que esta especie ha soportado volúmenes elevados de explotación en varios puntos de la costa del Pacífico [2].

A pesar de no conocer la presión de extracción de esta especie, su escasa presencia en lugares donde años anteriores era común encontrarlas además del reducido tamaño de los ejemplares capturados, sugieren que actualmente haya sobrepasado su capacidad de recuperación en el medio natural.

La sobreextracción, causada por la demanda del mercado actual puede ser solventada mediante el desarrollo de la producción de semillas en laboratorios. Sin embargo, información sobre el acondicionamiento de esta especie para la reproducción es muy escasa. En ambientes naturales, se han registrado períodos de madurez gonadal a temperaturas entre 28-32°C y salinidades constantes [2][3][4].

La obtención de gametos viables provenientes de desoves causados por estimulación artificial es la segunda fase para la producción de semillas. A pesar de no existir registros previos de inducciones al desove de *C. iridescens*, se tiene información de muchas investigaciones en otros bivalvos, de los cuales, los métodos más comunes implican cambios de temperatura [5,6,7,8,9], cambios de salinidad [10,11,12], sobrealimentación [13,14] y adición de gametos maduros [15].

Actualmente, la información sobre cultivos embrionarios y larvarios en especies del género *Crassostrea* es muy abundante, especialmente *C. gigas* [16], *C. virginica* [17], *C. belcheri* [18] *C. madrasensis* [19] y *C. rhizophorae* [17], no obstante, investigaciones en *C. iridescens* son inexistentes, requiriéndose de estudios sobre las variables ambientales que influyen sobre el crecimiento y supervivencia durante sus etapas de desarrollo embrionario y larvario.

El objetivo de este estudio fue evaluar la aplicación de estímulos externos para inducir desoves en *C. iridescens*, determinando el porcentaje de desoves, tiempo de respuesta a la inducción, producción y porcentaje de fertilización de óvulos. Finalmente se describe los primeros estudios de desarrollo embrionario y larvario hasta la fase de fijación.

2. Materiales y Métodos

2.1. Manejo de reproductores

Un total de 218 ejemplares de *C. iridescens* (Peso: 325,11±128,32 g; altura de la valva: 11,37±1,55 cm; longitud de la valva: 8,37±1,51 cm) fueron extraídos en dos puntos en zonas cercanas a la Comuna Ayangué, Provincia de Santa Elena, Ecuador

(01°57'54" S; 80°44'30" W y 01°58'27" S; 80°45'53" W).

Los organismos fueron limpiados del sedimento, algas, y epibiontes. Posteriormente, fueron colocados en tanques de 1 TM con circulación continua de agua de mar, aeración constante y desprovistos de alimentación (depuración) durante 3 días. Los reproductores de *C. iridescens* fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de acondicionamiento, donde fueron mantenidos durante 7 semanas. Los organismos del primer grupo (Acondicionamiento 28°C) fueron ubicados en 1 tanque de 18 TM con agua de mar filtrada (1µm) en un volumen operable de 6 TM, con aeración constante (>3,5 mgOD.L⁻¹), mantenidos a una temperatura del agua de 28,26±0,87°C. El segundo grupo (Acondicionamiento 22°C) fue mantenido con la temperatura del agua de mar registrado naturalmente durante el desarrollo de este trabajo (22,20±0,90°C).

La alimentación para ambos grupos de acondicionamiento estuvo basada en una ración diaria combinada de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* a una concentración de 150 y 100 células.µL⁻¹.día⁻¹ respectivamente. Diariamente, se realizó el 60% de recambio de agua diario y semanalmente un recambio total y remoción de epibiontes de las valvas de las ostras.

El tercer grupo de ostras (Acondicionamiento Reservorio) fue llevado al canal reservorio en la Estación Experimental CENAIM-ESPOL en la comuna Palmar (02°00'56" S; 80°43'29" W), Provincia de Santa Elena, Ecuador. La temperatura y salinidad fue de 24,46±2,09°C y 36,69±1,38 g.L⁻¹ respectivamente.

2.2. Determinación de la condición gametogénica

Se sacrificaron diez organismos luego de la extracción, diez después de la depuración, y diez ejemplares a las 6 semanas de cada uno de los acondicionamientos para determinar la etapa de madurez mediante cortes histológicos. La gónada fue fijada en solución Davidson durante 24 horas, posteriormente se siguieron las etapas de: deshidratación, clarificación, inclusión, corte transversal (4 µm), y finalmente la tinción con Hematoxilina y Eosina [20].

Los estadios gonádicos fueron determinados basándose en las características morfológicas de la gónada, presencia o ausencia de gametos y cantidad y grado de desarrollo de los mismos, considerando cinco etapas: Indeterminado, Desarrollo temprano, Desarrollo tardío, Madurez y Desove [4].

2.3. Inducción al Desove

Luego de 7 semanas de acondicionamiento, se evaluaron 7 estímulos externos (tratamientos) para la

inducción al desove. Se tomaron por separado 8 reproductores por cada ambiente (28°C, 22°C y *Reservorio*). Posteriormente fueron distribuidos al azar en 2 tanques de 15 L (2 réplicas con 4 organismos cada una). Los estímulos aplicados se describen a continuación:

1) *Cambios de temperatura cada 60 minutos (T60')*
Se realizó una disminución de 10°C a la temperatura del agua de acondicionamiento y se mantuvieron los organismos por 1 hora. Se agregó *I. galbana* (200 células.µL⁻¹). Pasado este tiempo nuevamente se colocaron las ostras a la temperatura de acondicionamiento 1 hora y luego se disminuyó 10°C de nuevo por otra hora.

2) *Cambios de temperatura cada 30 minutos (T30')*
La temperatura del agua se incrementó hasta 30°C (independientemente de la temperatura de acondicionamiento) y se mantuvo por 30 minutos. Posteriormente se disminuyó la temperatura hasta 22°C y se mantuvo por 30 minutos nuevamente. Este procedimiento fue repetido dos veces. Finalmente fue llevado a 30°C nuevamente y se dejó reposar a temperatura ambiente (23°C).

3) *Incremento de temperatura y desecación (TAD)*
Se incrementó 5°C la temperatura del agua de acondicionamiento por 1 hora, luego fueron colocados al aire libre durante 30 minutos (temperatura del aire: 23°C); posteriormente se ubicaron en agua con temperatura 5°C mayor a la de acondicionamiento nuevamente.

4) *Disminución de salinidad (Smenos)*: Se colocaron los reproductores en recipientes con agua de mar a salinidad de acondicionamiento (32 g.L⁻¹), posteriormente fueron colocados en agua con una salinidad de 15 g.L⁻¹ durante 30 minutos. Luego pasaron nuevamente a 32 g.L⁻¹ de salinidad durante otros 30 minutos; este proceso se repitió dos veces. La temperatura se mantuvo constante a la temperatura de acondicionamiento.

5) *Incremento de salinidad (Smas)*: Los animales fueron colocados en agua de mar con una salinidad 3 veces superior (96 g.L⁻¹) a la de acondicionamiento durante 30 minutos. Luego fueron puestos nuevamente a 32 g.L⁻¹ durante 30 minutos; este proceso se repitió dos veces. La temperatura se mantuvo constante a la temperatura de acondicionamiento.

6) *Sobrealimentación (SobA)*: Se inoculó *Chaetoceros gracilis* a una concentración de 2800 células.µL⁻¹ al agua que contenía las ostras la temperatura del agua para los tres grupos de acondicionamiento se mantuvo a 23°C.

7) *Adición de espermatozoides (Esp)*: Se extrajeron gametos de un organismo de *C. iridescens* macho. El material espermático fue puesto en un vaso de precipitación de 1 L (10 millones de espermatozoides.mL⁻¹). Cada 30 minutos se le agregó 100 mL del material espermático durante 2 horas. Se mantuvo la temperatura de acondicionamiento para cada grupo.

En todos los tratamientos después de una hora de aplicado el último estímulo se adicionó espermatozoides de la misma especie obtenidos por stripping. Las observaciones de la respuesta para todos los tratamientos de inducción duraron 3 horas a partir del último estímulo.

Tan pronto se produjeron los desoves, los organismos eran trasladados cuidadosamente a un recipiente de 30 L con agua de mar filtrada (1 µm) para que desoven libremente. Posteriormente, se filtraron los óvulos producidos por cada hembra a través de una malla nitex® de 100 µm. En el caso de los espermatozoides, estos fueron pasados por mallas de 100 y 30 µm. Se estimó el número total de óvulos liberados por cada hembra. Los óvulos fueron fecundados mediante la adición de espermatozoides a una proporción aproximada de 10:1 (espermatozoides:óvulos). El porcentaje de fecundación fue determinado luego de 30 minutos del contacto de los gametos.

En todos los tratamientos se estimaron las siguientes variables: a) Porcentaje de organismos desovados, b) Tiempo de respuesta desde el primer estímulo hasta el inicio de la liberación de gametos, c) Número de óvulos producidos por cada hembra, y d) Porcentaje de fertilización.

2.4. Larvicultura

Para el desarrollo embrionario y larvario se tomaron gametos provenientes de T60' y TAD obtenidos del acondicionamiento 28°C. Posterior a la fertilización, los huevos obtenidos fueron puestos en tanques cilíndricos de 1 TM con agua de mar filtrada (1 µm), tratada con UV y con piedras difusoras de aire para mantener el oxígeno del agua mayor a 3,5 mg.L⁻¹. Luego de 24 horas, las larvas D fueron sembradas a una densidad de 1,2 larvas.mL⁻¹. La temperatura del agua fue mantenida a 27,84±1,97 °C.

La ración alimenticia consistió en una dieta combinada de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. Durante los primeros 7 días se proporcionó el 70% y 30%, respectivamente, a partir del día 8 la combinación fue de 1:1 en número de células. Se inició con una concentración de 6 cél.µL⁻¹ hasta alcanzar 60 cél.µL⁻¹ a partir del día 18.

El recambio de agua fue del 100% cada 24 horas. El experimento se dio por terminado a los 30 días, cuando las larvas alcanzaron la etapa pediveliger.

2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del experimento fueron sometidos a la prueba de Levene para verificar homogeneidad de varianza y gráficamente se verificó la normalidad de los datos. Los valores obtenidos de los tiempos de respuesta de los organismos desovados fueron transformados con 1/x para cumplir con estas condiciones. Las demás variables evaluadas no fueron

transformadas. Para determinar diferencias significativas entre la producción de óvulos y fertilización de los tratamientos, se omitió el tratamiento *T60'*, debido a que solo presentaba 1 dato. Los datos fueron explorados por medio de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando hubo significancia al 95% ($\alpha=0,05$) se realizó la prueba de Scheffé. Todas las pruebas estadísticas fueron analizadas utilizando el software Statistica® versión 5.5. Para facilitar la interpretación los datos son presentados sin transformación como $\text{media} \pm \text{DS}$.

3. Resultados

3.1. Acondicionamiento de reproductores

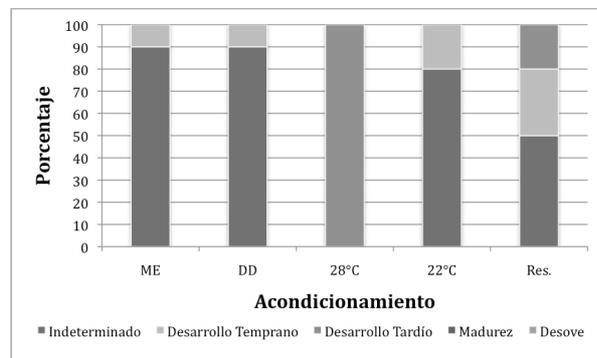


Figura 1. Etapas de madurez gonadal de *Crassostrea iridescens* antes y después de 7 semanas de acondicionamiento.

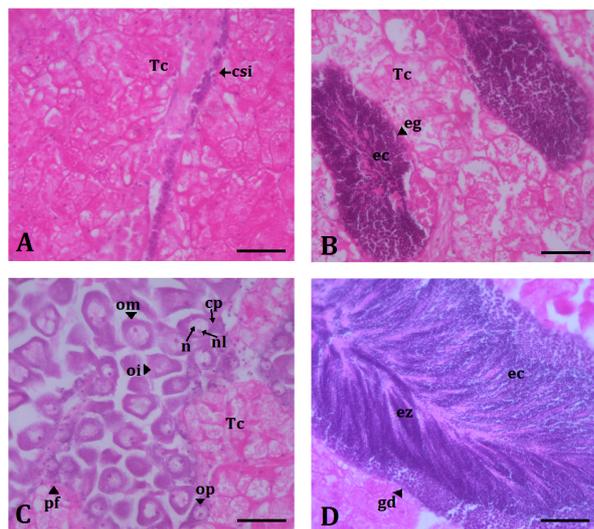


Figura 7. Etapas de desarrollo gonadal en *Crassostrea iridescens* (400X): (A) Indeterminado; (B) Desarrollo temprano - macho; (C) Desarrollo tardío - hembra; (D) Desarrollo tardío - macho. Tc: Tejido conectivo; csi: células sexuales indiferenciadas; eg: espermatogonios; ec: espermatocitos; om: ovocito maduro; oi: ovocito inmaduro; op: ovocito primario; pf: pared folicular; cp: citoplasma; n: núcleo; nl: nucléolo; ez: espermatozoides; gd: gonoducto. Tamaño de la barra=50 μm .

Con el acondicionamiento 28°C se obtuvo el mayor porcentaje de madurez para *C. iridescens*, registrando el 100% de los organismos en la etapa de desarrollo tardío (Fig. 1). La figura 2 muestra las etapas de desarrollo gonadal encontrados en este estudio y analizado por histología. En las figuras 2C y 2D se observan óvulos y espermatozoides respectivamente.

Por otra parte, se encontró presencia de hembras únicamente en los acondicionamientos 28°C y *Reservorio*. Sin embargo, en el grupo 28°C se registró el mayor porcentaje de hembras (60%) sin encontrarse organismos indeterminados.

3.2. Inducción al desove

El análisis posterior de las variables evaluadas en este estudio se lo realizó con los resultados obtenidos con el acondicionamiento 28°C que registró la mayor cantidad de desoves, con el 51,79% de los organismos estimulados en todos los métodos de inducción. El acondicionamiento 22°C solamente registró el 5,36% de los organismos estimulados (se produjeron 3 desoves en el tratamiento *T30'*, todos ellos machos, con un tiempo promedio de $3,73 \pm 0,68$ horas). Finalmente, el grupo *Reservorio* no registró desoves en ningún tratamiento de inducción.

3.2.1. Porcentaje de organismos desovados

De los 7 estímulos evaluados, con los tratamientos *T60'*, *T30'*, *TAD* y *Smenos* se obtuvieron porcentajes de desoves significativamente mayores ($P < 0,05$) que con los tratamientos *Smas*, *SobA* y *Esp*. De todos, con los que involucraron cambios repentinos de temperatura, se registraron mejores porcentajes de desoves (*T60'*: $87,5 \pm 17,7\%$; *T30'*: $87,5 \pm 17,7\%$ y *TAD*: 100% - Fig. 3).

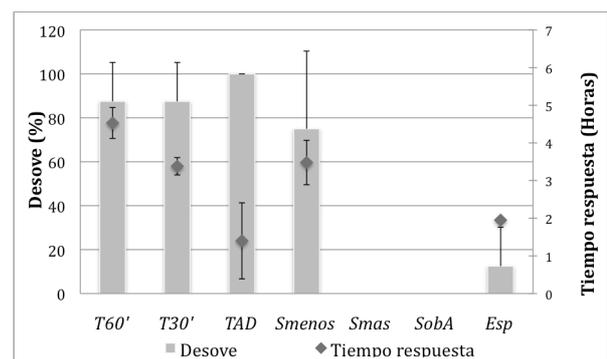


Figura 3. Porcentaje de organismos desovados y tiempo de respuesta promedio por tratamientos (Acondicionamiento 28°C).

El tratamiento *T30'* registró el mayor porcentaje de hembras desovadas con el 57,1% ($n=7$), seguido del *TAD*, con el 50% ($n=8$). A pesar de no existir diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los porcentaje de desove antes y después de adicionar espermatozoides, del 100% de los organismos

desovados en los tratamientos *T60'*, *T30'*, *TAD* y *Smenos*, el 75% de los desoves ocurrió después de la adición de espermatozoides. Sin embargo, en *TAD* se registró el 75% de desoves antes de la adición de espermatozoides.

3.2.2. Tiempo de respuesta a los estímulos de inducción

El tratamiento *TAD* produjo el tiempo de respuesta significativamente menor ($P < 0,05$) a los otros tratamientos con un promedio de $1,40 \pm 1,01$ h (*T60'*: $4,53 \pm 0,41$ h; *T30'*: $3,38 \pm 0,23$ h; *Smenos*: $3,48 \pm 0,59$ h y *Esp*: 1,95 h). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el tiempo de respuesta entre los tratamientos *T60'*, *T30'* y *Smenos* (Fig. 3).

3.2.3. Producción de óvulos y fertilización

De los 4 tratamientos donde las hembras produjeron desoves (*T60'*, *T30'*, *TAD* y *Smenos*), *TAD* obtuvo el promedio más alto con $47,19 \pm 32,12 \times 10^6$ óvulos liberados; seguido de *T30'*: $24,50 \pm 16,45 \times 10^6$ y *Smenos*: $20,80 \pm 6,22 \times 10^6$; sin que existan diferencias significativas ($P > 0,05$). El tamaño promedio de los óvulos liberados fue $46,95 \pm 1,53 \mu\text{m}$ ($n=20$). Los porcentajes de fertilización variaron entre 82 y 98%, siendo el tratamiento *TAD* el que obtuvo el porcentaje promedio significativamente más alto ($P < 0,05$) con $95,89 \pm 1,39\%$.

3.3. Desarrollo embrionario y larvario

El tamaño promedio de los óvulos fue $46,95 \pm 1,53 \mu\text{m}$ (Fig. 4a). La fertilización ocurrió aproximadamente 30 minutos luego del contacto entre los gametos, donde se pudo apreciar la formación del primer cuerpo polar (Fig. 4b).

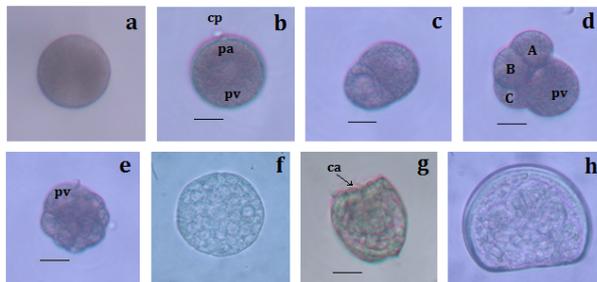


Figura 4. Desarrollo embrionario de *Crassostrea iridescens* en las primeras 24 horas: (a) óvulo [$46,95 \pm 1,53 \mu\text{m}$]; (b) cigoto; (c) primera división; (d) segunda división; (e) mórula; (f) blástula; (g) larva trocófora; (h) larva D. cp: cuerpo polar; pa: polo animal; pv: polo vegetal; A, B, y C: blastómeros; ca: cilio apical. Tamaño de la barra= $20 \mu\text{m}$.

Luego de 30 minutos, la primera segmentación divide el cigoto en dos células desiguales,

representadas por el polo animal y polo vegetal (Fig. 4c), sesenta minutos después ocurre la segunda división, donde los blastómeros se dividen en 4 células (Fig. 4d). Las posteriores divisiones resultan en la formación de la mórula y blástula, procesos que ocurrieron entre las 6-8 h (Fig. 4e,f). La fase de gástrula, seguida por la formación de larvas trocóforas activas, ocurrió entre las 10-12 h (Fig. 4g). Luego de transcurrido 22 a 24 horas se observaron las primeras larvas D, con una altura y longitud de la valva de $58,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ y $67,9 \pm 2,3 \mu\text{m}$ respectivamente ($n=20$) (Fig. 4h y Fig. 4a), dando inicio al desarrollo larvario.

Durante el desarrollo larvario, en el día 8 se tornó visible el umbo, evidenciando la fase de desarrollo temprano, con un tamaño de $94,9 \pm 12,1 \mu\text{m}$ (Fig. 5b), en ese momento, las larvas eran nadadoras activas, encontrándose mayoritariamente en la columna de agua. La fase umbonada tardía ($192,3 \pm 15,3 \mu\text{m}$) fue observada al día 21 de cultivo (Fig. 5c). A partir del día 25 se observó la presencia de la mancha ocular (Fig. 5c) y 5 días después, las primeras larvas con pie de fijación (estado pediveliger, $315,0 \pm 35,4 \mu\text{m}$) (Fig. 5e). En contraste, estas larvas se encontraban mayoritariamente en el fondo de los tanques, inclusive durante la alimentación. La fase post-larval fue registrada el día 35, con la aparición de la primera semilla (Fig. 5f), con un tamaño de $563 \mu\text{m}$, donde se pudo observar un desarrollo interno casi completo, con la presencia de un grupo de branquias rudimentarias.

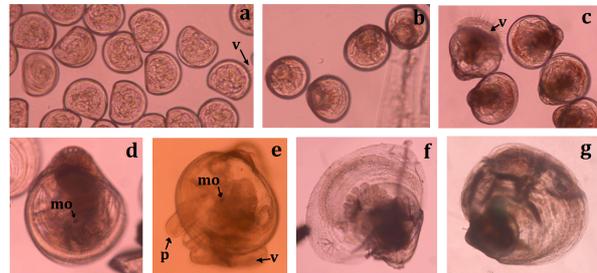


Figura 5. Desarrollo larvario y semilla de *Crassostrea iridescens* [altura de la valva \pm DE]: (a) larva D – día 1 [$58,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$]; (b) umbonada temprana – día 8 [$94,9 \pm 12,1 \mu\text{m}$]; (c) umbonada tardía – día 21 [$192,3 \pm 15,3 \mu\text{m}$]; (d) umbonada tardía con mancha ocular – día 25 [$233,4 \pm 60,5 \mu\text{m}$]; (e) pediveliger – día 30 [$315,0 \pm 35,4 \mu\text{m}$]; (f) semilla – día 35 [$563 \mu\text{m}$] y (g) semilla – día 43 [$880 \mu\text{m}$]. v: velo ciliado; mo: mancha ocular; p: pie de fijación.

A pesar de que en los primeros días de cultivo se observó baja mortalidad en las larvas, en el día 8 se registró una disminución de la supervivencia del 30% en relación al día anterior. La supervivencia fue registrada hasta el día 22, con el 1% de organismos vivos. Durante todo el desarrollo larvario fue evidente la presencia de protozoarios. La tasa de crecimiento diario desde la larva D hasta antes de la fijación (día 30) fue de $7,21 \mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$ considerando la altura de la valva. El desarrollo de la larva hasta el día 19 tuvo un

crecimiento constante, sin embargo, a partir de ese día, se notó mayor variabilidad en las tallas. Para registrar los promedios de las mediciones se consideraron todas las larvas (grandes, medianas, pequeñas).

4. Discusión

4.1. Desarrollo gonadal

La temperatura es el principal factor ambiental que regula el ciclo gametogénico en bivalvos marinos [21,22]. Depende del rango característico para cada especie. En medios naturales, registros de *C. iridescens* relacionan el incremento de la temperatura del agua con el inicio de la gametogénesis [2,3,4].

En este estudio, las ostras fueron colectadas del medio natural a inicios de septiembre (23°C). Las observaciones histológicas mostraron que en este período el 90% de los organismos se encontraban en etapa indeterminada. Mientras que luego de 6 semanas de acondicionamiento, el 100% de los organismos mantenidos a 28°C, alcanzaron la etapa de desarrollo tardío, a diferencia del acondicionamiento a 22°C, con el 80% en etapa indeterminada y el 50% de los organismos del tratamiento *Reservorio* evidenciaron indicios de gametogénesis, en este último, la temperatura del agua varió entre 24 y 27°C durante las tardes. Marín (2011) observó estadios gonadales avanzados (33% en etapa de madurez) luego de 30 días de acondicionamiento en el mismo canal reservorio utilizado para estudio [23]. No obstante, la temperatura fue mayor (27,01±2,02°C).

Todos estos resultados evidencian la posibilidad de que la temperatura sea el principal factor ambiental que regula la gametogénesis de la ostra nativa *C. iridescens*, pudiendo alcanzar etapas avanzadas de desarrollo gonadal con temperaturas superiores a 27°C.

El suplemento alimenticio constituye otro factor de importancia durante la gametogénesis [24,25]. Estudios mencionan que el contenido lipídico de los huevos en bivalvos depende de la disponibilidad alimenticia hacia las hembras durante la gametogénesis, permitiendo un eficaz desarrollo embrionario y larvario [25,26]. La mezcla compuesta por microalgas (*Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*) ricas en ácidos grasos altamente insaturados suministrada a los reproductores en este trabajo, brindan las condiciones nutricionales necesarias para el desarrollo gonadal, viéndose reflejado en el vigor del embrión y larva durante la cría [16,17]. La combinación de ambas microalgas ha sido utilizada exitosamente en *Nodipecten nodosus* [7] y *O. chilensis* [25]. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que ostras maduras pueden ser obtenidas en laboratorios sin adicionar alimento durante el acondicionamiento, debido a que en épocas frías se produce una acumulación de suficientes reservas nutricionales que provee energía durante la

gametogénesis [24]. Por otro lado, se ha reportado que el suplemento adicional de alimento durante el desarrollo gonadal es esencial y que las reservas acumuladas en la glándula digestiva previa a la gametogénesis no son suficientes para soportar este proceso [21]. En este estudio, el acondicionamiento 22°C, a pesar de recibir la misma calidad y ración alimenticia que el acondicionamiento 28°C, no evidenció gametogénesis, lo que enfatiza la dependencia de la temperatura para iniciar dicho proceso.

4.2. Inducción al desove y tiempo de respuesta

De todos los estímulos evaluados en este estudio, los que involucraron cambios de temperatura y descenso de salinidad registraron desoves. Si bien no existen reportes de desoves de *C. iridescens* en laboratorio, estos resultados tienen similitud con registros de desoves de esta especie en medios naturales [2,3,4].

La temperatura es el factor exógeno más importante que regula los desoves en bivalvos [22]. El método de inducción *TAD* utilizado en este estudio, que involucró un aumento de la temperatura y posterior desecación resultó ser el estímulo más exitoso para *C. iridescens* al obtener desoves en todos los organismos, tanto machos como hembras, y alcanzar en promedio el menor tiempo de respuesta (1,40±1,01 h). El incremento de la temperatura para generar desoves en laboratorio ha sido reportado además en otros bivalvos [5,6,7].

La reducción de la salinidad ha mostrado ser un estímulo importante para el desove de ostras tropicales. En este estudio, la disminución de la salinidad (*Smenos*) produjo desoves en ambos sexos. Similares resultados han sido reportados en otras especies [10,11]. Se ha sugerido que desoves obtenidos disminuyendo la salinidad pueden tener una influencia importante en la supervivencia larval [11]. Por otra parte, el método de inducción *Smas* a pesar de haber obtenido desoves en *Rangia cuneata*, *C. virginica* y *Geukensia demissa* [12], y *C. madrasensis* [10], en este trabajo no se evidenciaron desoves. Ha sido registrado que cambios rápidos de salinidades en *C. gigas* tienen como efecto inicial la contracción parcial o completa del músculo aductor dependiendo de la salinidad, considerando además, que salinidades superiores resultan ser intolerables para esta especie [27]. Es probable que durante el incremento rápido de salinidad realizado en este trabajo haya tenido como consecuencia el cierre total de las valvas en *C. iridescens*, no siendo afectado por el cambio brusco de salinidad.

A pesar que la presencia de gametos ha sido reportada como un estimulante de desoves en almejas [15], y la sobrealimentación en *Siliqua patula* [13], en el presente trabajo, los tratamientos que involucraron únicamente la presencia de espermatozoides (*Esp*) y

sobrealimentación (*SobA*) no resultaron ser métodos efectivos. Sin embargo, cabe mencionar que el mayor porcentaje de desoves en los tratamientos *T60'*, *T30'*, y *Smenos* fueron registrados posterior a la adición de espermatozoides, inclusive se notó la liberación de gametos tanto en machos como hembras pocos segundos después de adicionarlo. Estudios mencionan que en ciertos casos la termoestimulación sola no es suficiente para inducir desoves, sino que requieren una estimulación adicional como la adición de pequeñas cantidades de espermatozoides u óvulos extraídas de gónadas maduras de la misma especie [28]. Estas observaciones sugieren que la presencia de espermatozoides de *C. iridescens* puede estimular a organismos de la misma especie a generar desoves, siempre que éstos reciban algún estímulo externo previo. Es probable que las gónadas maduras de esta especie contengan feromonas que induzcan a otras a desencadenar desoves [29].

4.3. Producción y fertilización de óvulos

No se evidenciaron diferencias significativas entre la cantidad de óvulos liberados en los diferentes tratamientos. Esto sugiere que en esta especie, la liberación de gametos es independiente de los tipos de estímulos utilizados. Sin embargo, cabe mencionar que la cantidad de óvulos liberados en los bivalvos depende también de otros factores como el estado de madurez y el tamaño del organismo [8,17].

Los porcentajes de fertilización de los gametos obtenidos en este estudio variaron entre 82 y 98%, siendo en general mayores comparados con otras especies como *A. nucleus* (45-76%) y *M. edulis* (51%) [6]. Esto sugiere que esta especie, puede ser altamente fecunda una vez alcanzado etapas avanzadas de madurez gonadal, y que los estímulos evaluados permiten la liberación de un porcentaje elevado de gametos viables. El estímulo *TAD*, si bien produjo el mayor porcentaje de fertilización con el 95,89±1,39%, no existe evidencia suficiente para determinar que se debió al estímulo en sí.

4.4. Desarrollo embrionario y larvario.

La talla, forma, y características de las diferentes fases embrionarias y larvarias de *C. iridescens* hasta el momento de la fijación fueron similares a los descritos previamente para otras especies de bivalvos [16,17,19,30]. La larvicultura del presente estudio fue realizada como un ensayo con la finalidad de registrar los primeros estudios de desarrollo embrionario y larvario de esta especie bajo condiciones controladas en laboratorio.

Los altos porcentajes de mortalidad registrados en este trabajo, especialmente a partir del día 7, pudo deberse a la presencia de gran cantidad de protozoarios. Similar observación ha sido reportado para *C. madrasensis* [19].

5. Conclusiones

La temperatura del agua es posiblemente el principal factor ambiental que influye en la gametogénesis del ostión de roca *Crassostrea iridescens*.

Ostras de *C. iridescens* son sensibles a estímulos externos específicos, tales como cambios de temperatura y disminución de salinidad siempre que se encuentren en estadios avanzados de madurez gonadal.

La adición de espermatozoides puede potenciar el éxito del desove, siempre que el organismo reciba algún estímulo externo previo.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al CICYT por el financiamiento de este trabajo y al personal de los laboratorios de Fitoplancton, Histopatología y Moluscos de CENAIM-ESPOL, por las facilidades brindadas.

6. Bibliografía

- 1) Mora, E. Catálogo de bivalvos marinos del Ecuador. Boletín Científico y Técnico. Instituto Nacional de Pesca. Vol X (1): 1990. 51 pp.
- 2) Cuevas, C.A. y Martínez, A. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C. palmula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley de San Blas, Nayarit, México (Bivalvia: Ostreidae). An. Cent. Cienc. Mar Limnol., Univ. Nal. Autón. México, 1979. 6:81-98.
- 3) Stuardo, J. y Martínez, A. Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de población de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. Trabajo presentado al V Congreso Nacional de Oceanografía, México. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. 1974. 45 pp.
- 4) Fournier, M.L. The reproductive biology of the tropical rocky oyster *Ostrea iridescens* (Bivalvia: Ostreidae) on the Pacific coast of Costa Rica. Aquaculture, 101. 1992. 371-378.
- 5) Matias, D., Joaquim, S., Leitão, A. and Massapina, C. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussates* (Linné, 1758). Aquacult Int. 17: 2009. 257-271.
- 6) Pronker, A.E., Nevejan, N.M., Peene, F., Geijsen, P., and Sorgeloos, P. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. impact of different micro-algae mixtures on

- broodstock performance. *Aquacult Int.* 16: 2008. 297-307.
- 7) De la Roche, J.P., Marín, B., Freitas, L., and Vélez, A. Embryonic development and larval and post-larval growth of the tropical scallop *Nodipecten (=Lyropecten) nodosus* (L. 1758) (Mollusca: Pectinidae). *Aquaculture Research*. 33. 2002. 819-827.
 - 8) Soria, G., Tordecillas-Guillen, J., Cudney-Bueno, R. and Shaw, W. Spawning Induction, Fecundity Estimation, and Larval Culture of *Spondylus calcifer* (Carpenter, 1857) (Bivalvia: Spondylidae). *Journal of Shellfish Research*, 29(1): 2010. 143-149.
 - 9) Velasco, L.A., Barros, J., Acosta, E. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture* 266, 2007. 153-165.
 - 10) Rao, K.V. Observation on the probable effect of salinity on the spawning, development and setting of the Indian backwater oyster, *Ostrea madrasensis* Preston. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 33B(5). 1951. Pp. 231-256.
 - 11) Southgate, P. C. and Lee, P.S. Hatchery rearing of the tropical blacklip oyster *Saccostrea echinata* (Quoy and Gaimard). *Aquaculture* 169: 1998. 275-281.
 - 12) Nava, D., y. García de Severeyn. Desove inducido en moluscos bivalvos del sistema de Maracaibo. *Ciencia* 18(3): 2010. 153-164.
 - 13) Breese, W.P. and Robinson, A. Razor clams, *Siliqua Patula* (Dixon): Gonadal development, induced spawning and larval rearing, *Aquaculture*, 22, 1981. 27-33.
 - 14) Illanes, J. Acondicionamiento de reproductores de moluscos y factores que inciden en la evacuación de gametos. Capítulo II. Primer Curso Internacional. "Producción de semillas de moluscos bivalvos". Universidad Católica del Norte, Chile. 2010. 272 pp.
 - 15) Ellis, S. Spawning and Early Larval Rearing of Giant Clams (Bivalvia: Tridacnidae). Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Publication Number No. 30. 1998. Pp. 1-55.
 - 16) Utting, S.D., and Spencer, D.E. The hatchery culture of bivalve mollusk larvae and juveniles. Lab. Leaflet, MAFF Fish Res., Lowestoft, (68). 1991. 31 pp.
 - 17) Helm, M., Bourne, N., and Lovatelli A. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma. 2006. 184 pp.
 - 18) Tan, S., and Wong, T. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival and setting in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). *Aquaculture* 145: 1996. 129-139.
 - 19) Samuel, D. Early larval development of Edible oyster *Crassostrea madrasensis* (Perston). *Proc. Symp. Coastal Aquaculture*, 2: 1983. 483-487.
 - 20) Bell, T. and Lightner, D. A handbook of normal shrimp histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. 1998. 198 pp.
 - 21) Sastry, A.N. Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 130: 1966. 118-134.
 - 22) Barber, B.J. and Blake, N.J. Reproductive physiology. In: S. E. Shumway y G.J. Parsons (editors). *Scallops: biology, ecology and aquaculture. Chapter 6*: 2006. 375-416.
 - 23) Marín, H. Evaluación de Diferentes Regímenes de Alimentación para el Acondicionamiento Reproductivo de la Ostra Nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Ecuador, 2011. 94 pp.
 - 24) Chavez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.C., and Le Pennec, M. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: Origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214: 2002. 115-130.
 - 25) Wilson, J., Chaparro, O. and Thompson, R. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Crassostrea chilensis*. *Aquaculture*, 139: 1996. 63-75.
 - 26) Farías, A., and I. Uriarte. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.* 20: 2001. 97-105.
 - 27) Hopkins, A.E. Adaptation of the feeding mechanism of the oyster (*Ostrea gigas*) to changes in salinity. *Bulletin of the bureau of fisheries*. Volume XLVIII. Bulletin No. 21. 1936.
 - 28) Galtsoff, P.S. Ohysiology of reproduction of *Ostrea virginica*. I Spawning reactions of the female and male. *Biol. Bull.*, 74: 1938. 461-486.
 - 29) Heslinga, G., Watson, T., and Isamu, T. Giant clam farming, Pacific fisheries development foundation (NMFS/NOAA), Honolulu, Hawaii, USA, 1990. 179pp.
 - 30) Wallace, R. K. Cultivating the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 432. 2001.