

Optimización del protocolo de producción larvaria para estirpes tropicalizadas de *Magallana gigas*: efecto de la dieta unialgal en el acondicionamiento reproductivo

Optimization of the larval production protocol for tropicalized lineages of *Magallana gigas*: effect of unialgal diet on reproductive conditioning

Estefanía S. Oña-Pérez¹ , Jimmy Villón-Moreno¹ , Xavier Vicente Piguave-Preciado¹ , Alberto García² , Luis Freites³ 

¹Universidad Estatal Península de Santa Elena, Av. Principal la Libertad, Ecuador

²Proyecto Ostras, Laboratorio de semillas de *Crassostrea gigas*, comuna El Real-Chanduy, Santa Elena, Ecuador

³Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, 6101, Estado Sucre, Venezuela

Correspondencia: Luis Freites **E-mail:** lfreitesv@yahoo.es

Original article | Artículo original

Palabras clave

dieta microalgal
índice gonadosomático,
índice de condición,
larvas competentes
stock de reproductores

RESUMEN | La reproducción demanda mucha energía en el ciclo de vida los bivalvos y el acondicionamiento de los reproductores afecta la viabilidad de los gametos y el posterior desarrollo embrionario y larvario. El objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de tres diferentes concentraciones unialgales de la diatomea *Chaetoceros gracilis*, suministradas como alimento para la inducción al desarrollo gonádico y sus subsecuentes desoves de reproductores y en el desarrollo larvario de estirpes tropicalizadas de la ostra del Pacífico *Magallana gigas*. Para tal fin, fueron trasladados 150 reproductores hasta el laboratorio, limpiados de comunidades incrustantes y se tomaron sus valores biométricos cada 15 días por 45 días. La muestra fue dividida en tres lotes de 50 ostras, y estos nuevamente fueron separados al azar en 3 lotes o réplicas de 16 ostras y colocados en tanques de plástico de 3 TM con agua de mar, a 35 ppm y 27 °C, con concentraciones microalgales de 1,2x10⁶ cel./mL (C. Baja), 1,5x10⁶ cel./mL (C. Media) y 1,8x10⁶ cel./mL (C. Alta), equivalentes al 1,06, 1,32 y 1,58% de la biomasa húmeda de los tejidos blandos de las ostras. Al término del periodo de acondicionamiento se realizó una inducción al desove mediante shock térmico (de 27°C a 35°C), respondiendo 15 hembras y 17 machos alimentadas con la C. alta que permitieron obtener 30 millones de ovocitos, 5 hembras y 8 machos alimentadas con la C. media con 1 millón de ovocitos (C. Media), sin observarse desoves en las ostras en C. Baja. El desarrollo de los estadios larvarios tuvo una duración de 15 días, desde larva “D” hasta la fijación; la sobrevivencia larvaria fue de 14% (C. Alta); mientras que el 50 % de larvas de la C. Media no superaron la etapa pediveliger. Se recomienda el acondicionamiento de los reproductores con la dieta C. Alta debido a que indujo mayores índices gonadosomáticos y porcentajes de desoves, así como mayor producción larvaria, en términos cualitativos y cuantitativos.

Keywords

microalgal diet
gonadosomatic index
condition index
competent larvae
broodstock

ABSTRACT | Reproduction demands a lot of energy in the life cycle of any bivalve species and the conditioning of the brood stock affects the viability of the gametes and subsequent embryonic and larval development. The aim of this study was to determine the influence of three different unialgal concentrations of the diatom *Chaetoceros gracilis*, offered as food for the induction of gonadal maturation and the subsequent spawning of the reproducers and larval development of tropicalized lineages of the Pacific oyster *Magallana gigas*. For this purpose, 150 reproductive oyster were transferred to the laboratory, cleaned of biofouling, and their biometric values were taken every 15 days for 45 days. Then, the 150 individuals were divided into three batches of 50 oysters, and these again were randomly separated into 3 batches or replicas of 16 oysters and placed in 3 MT plastic tanks with salt water, 35 ppm and 27 °C, with microalgae concentrations of 1.8x10⁶ (High C.), 1.5x10⁶ (Medium C.) and 1.2x10⁶ (Low C.) million cells/mL, equivalent to 1.06, 1.32 and 1.58% of the wet biomass of soft tissues of the oysters. At the end of the conditioning period, spawning was induced by thermal shock (27°C to 35°C.), responding 15 females and 17 males that allowed the production of 30 million oocytes (High C.), 5 females and 8 males with 1 million oocytes (Medium C.), while no spawning was observed from oysters at Low C. The development of different larval stages lasted 15 days, from “D” larva to Pediveliger; the survival rate was 14% (High C.); while 50 % of the larvae of Medium C. did not exceed the pediveliger stage. The conditioning of the broodstock with a high concentration diet is recommended, because it induced higher gonadosomatic indices and percentages of spawning, as well as a greater larval production in qualitative and quantitative terms.

INTRODUCCIÓN

La ostra *Magallana* (= *Crassostrea*) *gigas* (Thunberg, 1793) es una especie originaria de aguas templadas y hoy en día es la más importante para la acuicultura de moluscos en el mundo, dependiendo sus actividades de cultivo del uso de semillas producidas en criaderos. No obstante, el funcionamiento de los criaderos y la eficiencia de los procesos involucrados siguen siendo aspectos que aún pueden ser optimizados (Reinaga-Franco *et al.* 2020).

A pesar de que el acondicionamiento reproductivo de *M. gigas* ha sido ampliamente documentado en latitudes templadas (Mercer *et al.* 2024), la transferencia de estos protocolos al trópico presenta desafíos fisiológicos únicos debido a la previa adaptación de las estirpes a regímenes térmicos más elevados. La falta de protocolos estandarizados para organismos ya 'tropicalizados' probablemente limitaría el desarrollo de la acuicultura local.

En este sentido, los programas de cría de moluscos requieren de la maduración de los reproductores, que generalmente se logra imitando las condiciones ambientales, aspectos que incluyen principalmente el manejo de la temperatura y de las dietas que incluyan la cantidad y calidad del alimento (Barber y Blake 2006). Estas dietas promueven la viabilidad de los gametos y el posterior desarrollo embrionario y larvario (Wilson *et al.* 1996, Fariás y Uriarte 2001, Helm *et al.* 2004).

Se han descrito métodos exitosos para la inducción a la gametogénesis y maduración de las gónadas de diferentes especies de ostras, que involucran cambios en su alimentación mediante dietas microalgales que aportan a su contenido energético. Entre estas especies pertenecientes a la familia Ostreidae se puede citar a: *Ostrea edulis* (Araya *et al.* 2012), *Striostrea prismatica* (Argüello-Guevara *et al.* 2013, Lodeiros *et al.* 2017), *Crassostrea belcheri* (Chotipuntu 2005); *C. angulata* (Anjos *et al.* 2017), *C. corteziensis* (Mazón-Suástegui *et al.* 2019) y *M. gigas* (Hendriks *et al.* 2003, Delaporte *et al.* 2005, Adams *et al.* 2013, Cardoso *et al.* 2019). La efectividad de estos métodos varía dependiendo de la especie, el estado de madurez y las condiciones ambientales (Argüello-Guevara *et al.* 2013).

La reproducción es uno de los procesos fisiológicos más importantes y demandantes de energía en el ciclo de vida de cualquier especie de bivalvo (Enríquez-Díaz *et al.* (2009). Por definición, las técnicas de acondicionamiento gonadal en bivalvos marinos permiten acelerar, mantener o retrasar el desarrollo gonádico, mediante el control de los parámetros o variables con mayor influencia en el ciclo gametogénico, lo que permitiría obtener reproductores en diferentes épocas del año (Mazón-Suástegui 2005).

Bajo condiciones controladas en el laboratorio, se ha descrito que *M. gigas* alcanza la madurez fisiológica de los gametos en un plazo de 6 a 8 semanas (FAO 2009), obtenida bajo variables ambientales específicas, descrita en esa fuente literaria. No obstante, la aplicación de la metodología para el acondicionamiento reproductivo descrita por otros autores no garantiza el éxito, en términos de producción de juveniles, sobre todo si se realiza en otras latitudes, con reproductores de diferente origen geográfico y estirpe genética, etc. Así, el óptimo manejo de los reproductores es un factor importante en el proceso de cultivo de bivalvos en un criadero, y generalmente se logra manipulando la temperatura y los regímenes alimentarios en el laboratorio, aunque no siempre con total éxito (Wilson *et al.* 1996).

Así, el acondicionamiento de bivalvos a menudo se ha cuantificado en términos de la calidad de los huevos y de las larvas producidas, en particular, el contenido de lípidos (triacilglicérols) del huevo, que se correlaciona positivamente con la supervivencia del embrión (etapa lecitotrófica), y las subsiguientes etapas larvarias previas a la alimentación (Gallager *et al.* 1986, Wilson *et al.* 1996, Cannuel y Beninger 2005, González-Araya *et al.* 2011). El éxito de las primeras etapas del desarrollo larvario es influenciado por la calidad del huevo, en términos de reservas energéticas (Helm *et al.* 1973, Holland y Spencer 1973, Bayne *et al.* 1975, Kraeuter *et al.* 1982, Cannuel y Beninger 2005).

Además, algunos estudios sobre las ostras *O. edulis* y *M. gigas* han demostrado que, bajo condiciones de estrés, particularmente con raciones de alimentos bajas, la fecundidad y la calidad de los huevos se reducen, lo que resulta en pocas larvas y/o estas resultan menos competentes (Lannan *et al.* 1980, Bayne *et al.* 1972, Muranaka y Lannan 1984, Gallager *et al.* 1986, Berntsson *et al.* 1997, Cannuel y Beninger 2005).

Es evidente que el desarrollo de estudios encaminados al control de la reproducción y producción de semillas de ostras, bajo condiciones controladas de laboratorio (*hatchery*), pueden ayudar a superar algunos cuellos de botellas, como son la obtención de desoves exitosos con altos porcentajes de fecundación y de sobrevivencia larvaria y postlarvaria. Dichas técnicas

permitirían el desarrollo de una producción comercial estable y sostenida de la ostra del Pacífico, en aguas tropicales del Ecuador. Por lo tanto, el presente trabajo evalúa el efecto de diversas concentraciones de dietas unialgales en la maduración, desove y desarrollo larvario de la ostra *M. gigas*, con el fin de establecer las bases tecnológicas necesarias para la producción autosustentable de semilla en ecosistemas tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio se realizó en la provincia de Santa Elena, Parroquia de Chanduy, Comuna El Real (Fig. 1), donde se encuentra ubicado el “Laboratorio de Semillas para la Reproducción y Cultivo de la Ostra del Pacífico *Magallana gigas*” (2°23'19" S; 80°43'16" W).

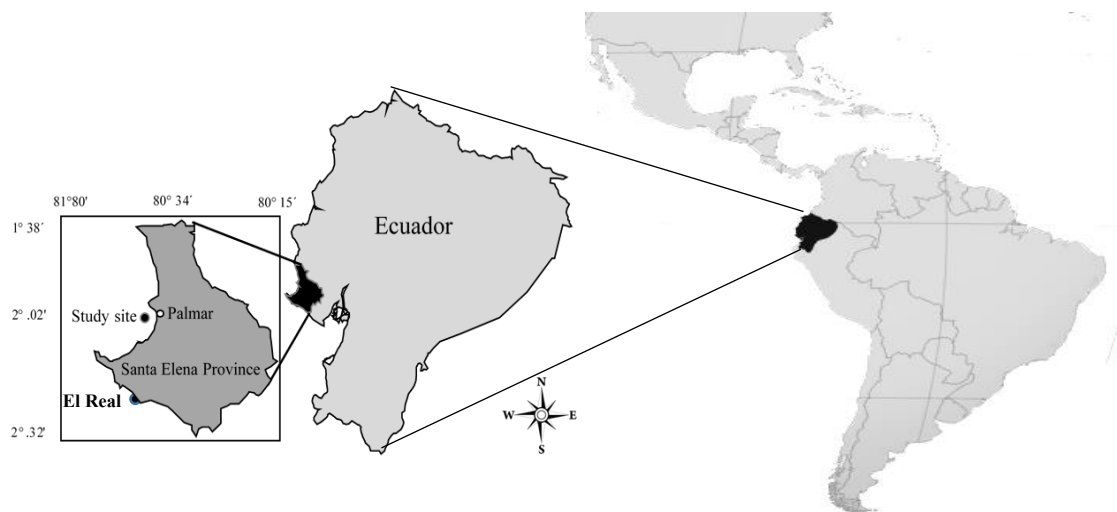


Figura 1. Ubicación geográfica del “Laboratorio de Reproducción y Cultivo de Ostras *Magallana gigas*”, Provincia de Santa Elena, Comuna El Real, Ecuador.

Figure 1. Geographic location of the “*Magallana gigas* Oyster Reproduction and Cultivation Laboratory”, Santa Elena Province, El Real Commune, Ecuador.

Pretratamiento del agua utilizada dentro del laboratorio

El agua tomada del ambiente mostró una salinidad poco variable de 35 ‰. Esta fue pre-filtrada consecutivamente por 5μ (Filtros de manga de polipropileno) y 1μ (filtro de diatomeas) de retención. De manera rutinaria, el agua fue vertida en tanques reservorios de 3.000 L de capacidad, donde fue clorada a una concentración de 10 ppm, con aireación y en la oscuridad, por un periodo de un 24 h. Una vez culminado el reposo, se agregó tiosulfato para neutralizar el cloro y EDTA para quelar metales pesados en el agua. Posteriormente fue irradiada con luz UV y pasada por filtros de carbón activado y arena. El pH que varió entre 7,9-8,4.

Cultivo de microalgas

El agua utilizada dentro del laboratorio se sometió a un proceso en la autoclave (120 °C/20 min), con la finalidad de garantizar la condición estéril del medio de cultivo. Con esta agua, se dió comienzo al escalamiento en el volumen de cultivo desde las fiolas y hasta botellones de 18 L. Las cepas de microalgas se cultivaron con medio f/2 (Guillard y Ryther 1962), con suplemento de sílice para diatomeas (*Chaetoceros* sp.), a una temperatura de 25 ±1°C, ciclo de luz de 24 h continuas provista por dos lámparas LED con potencia de 1.800 lúmens c/u. No fue adicionado CO₂. Estos cultivos fueron aireados de manera constante con el objetivo de evitar el estancamiento de la columna de agua. Cuando el cultivo de las microalgas se encontraba en etapa de crecimiento exponencial fueron cosechadas y se sembraron en tanques para escalar el cultivo hasta un volumen de 3.000 L. Para este proceso se empleó una relación de tiempos de 3:4:3 (3 días en cepa, 4 días en fiolas y 3 días en botellones de 18 L). Los tanques fueron aireados mediante un flujo constante de aire filtrado, suministrado por un equipo aireador de 1,5 HP.

Para alimentar los cultivos larvarios y la fijación de semillas, se llevaron a cabo conteos en un recipiente de 20 L que albergaban 3.200.000 cél./mL de *Chaetoceros*, 2.800.000 cél./mL de *Isochrysis galbana* y 5.000.000 cél./mL de *Tetraselmis chui*, representando las concentraciones máximas de células por cultivo. Los conteos de las densidades celulares de la microalgas fueron realizados con cámara de Neubauer.

Origen y tratamiento inicial del stock de reproductores

Una vez obtenidas las ostras cultivadas en el medio ambiente marino, estas fueron limpiadas “*in situ*” con agua de mar y la ayuda de un cepillo de cerdas semiduras para eliminar el material sedimentado sobre la concha. En el laboratorio se realizó una nueva limpieza externa con un cepillo de cerdas duras, y con ayuda de pinzas se retiraron organismos de la fauna marina incrustada sobre la concha. Seguidamente se midió el largo de la concha con un calibrador vernier (0,01 mm de precisión). El ensayo se inició con la inducción inicial del desove de los reproductores mediante shock térmico (24-35 °C/30 min) con la idea de equiparar la condición sexual inicial de los mismos. Los que no respondieron positivamente al desove fueron descartados. El resto de los individuos fueron divididos en tres lotes de 50 ostras, y estos nuevamente fueron separados al azar en 3 lotes o réplicas de 16 individuos y colocados por separado en tanques de plástico de 3 TM, a una temperatura de 27 °C, con concentraciones microalgales de $1,8 \times 10^6$ cél./mL (C. Alta), $1,5 \times 10^6$ cél./mL (C. Media) y $1,2 \times 10^6$ cél./mL (C. Baja), equivalentes al 1,06, 1,32 y 1,58% de la biomasa húmeda de los tejidos blandos de las ostras. Tres veces al día se realizó un conteo de algas con ayuda de una cámara de Neubauer, para controlar la concentración de la microalga y proceder al ajuste de la ración alimenticia (Tabla 1).

Tabla 1: Ración diaria de alimento suministrada a los reproductores para mantener las 3 concentraciones de microalgales (Número celx10⁶/mL).

Table 1: Daily feed ration supplied to broodstock to maintain the 3 microalgal concentrations (number of cells x10⁶/mL).

Concentración microalgal	Ración de la mañana (1 TM)	Ración del Medio día (1 TM)	Ración en la Tarde (1 TM)	Ración total diaria	Concentración en el tanque
Alta	2,5	2,5	2,5	7,5	1,8
Media	2,0	2,0	2,0	6,0	1,5
baja	1,6	1,6	1,6	4,8	1,2

Después de 15 días, se tomaron nuevamente las medidas biométricas, proceso que posteriormente fue repetidos 3 veces, hasta culminar los 45 días del bioensayo. El protocolo para la disección de la ostra consistió en pesar primero la ostra entera (masa total). Posteriormente se separaron los tejidos blandos la ostra con la ayuda de un equipo de disección, evitando dañar el manto y la gónada. Seguidamente se separaron la gónada, músculo y el resto de los tejidos blandos de la concha, estos componentes del cuerpo de la ostra fueron pesados con una balanza digital (OHAUS Adventurer, $\pm 0,001$ g). Luego se tomaron muestras del saco gonadal y se observaron bajo el microscopio.

Los valores de la masa de la concha, músculo, gónada y restos de los tejidos blandos se sumaron para obtener la masa húmeda total del cuerpo de la ostra. Con estos valores se calcularon el índice gonadosomático (IGS) siguiendo la metodología descrita por Jonsson *et al.* (1991) para expresar las proporciones de la masa húmeda de la gónada en relación a la masa húmeda del cuerpo somático, mediante la ecuación:

$$\text{IGS} = (\text{masa húmeda de la gónada} / \text{masa húmeda total del cuerpo}) \times 100:$$

Mientras que para el índice de condición fue seguida la metodología descrita por Walne (1976) para expresar las proporciones de la masa húmeda de los tejidos blandos en relación a la masa húmeda de la concha, y se calculó como:

$$\text{IC} = (\text{masa húmeda de los tejidos blandos} / \text{masa húmeda de la concha}) \times 100:$$

Variables de cultivo en los tanques de maduración de los reproductores

Los datos de las variables ambientales medidas en los tanques de acondicionamiento reproductivo fueron registrados cada 3 días, incluyendo la temperatura, salinidad y el pH. Luego, se procedió al recambio parcial diario del 50% del volumen de los tanques, mientras que el recambio total se realizó cada tercer día. Durante los recambios diarios del volumen de los tanques se realizó un sifoneo del fondo de los tanques para eliminar el material sedimentado (heces, pseudoheces y alimento no consumido). La temperatura fue registrada con un termómetro digital marca TDS-3 (TDS/TEMP), la salinidad se midió con un refractómetro manual ATAGO S/Mill (intervalo 0–100 ppm) y el pH con su equipo marca pH Meter (intervalo 0.00

– 14.00). El agua de mar fue previamente filtrada con filtros de manga de 5 μm e irradiada con luz UV. Los tanques fueron aireados mediante un flujo constante de aire suministrado por un equipo aireador de 1,5 HP.

Maduración gonádica del stock de reproductores

Antes de proceder al bioensayo de inducción reproductiva, los individuos fueron sumergidos en bandejas con agua durante una hora para la eliminación de impurezas acumuladas en el tracto digestivo. Este procedimiento se realizó con el objetivo de prevenir desoves en los tanques de maduración, asegurando así que todas las ostras inicien su maduración gonádica de manera uniforme. Al término de este periodo los individuos fueron colocados en cestas suspendidas a una profundidad de alrededor de 30 a 50 cm por debajo de la superficie del agua y así iniciar el tratamiento con las 3 concentraciones unialgales propuesta.

Inducción al desove

Después de transcurrido el período de 45 días recomendados por Cisneros (2017) como el tiempo necesario para obtener un desove exitoso, se identificaron los recipientes y se les agregó un volumen de agua de 4 L, donde se colocarían los reproductores con respuesta positiva a la inducción al desove, que correspondían a las diferentes concentraciones microalgales (baja, media y alta). Al término del proceso de desove de los reproductores, fueron tomadas muestras de agua de 2 mL, y se colocaron en un vidrio de reloj. También se colocó 1 gota en un porta-objeto para su observación en los microscopios binocular óptico modelo BM-700 Boeco, y estéreo-microscopio modelo Model BS-80 Boeco.

El proceso del desove de *M. gigas* se realizó en el laboratorio, extrayendo los ejemplares de los tanques y manteniéndolos en reposo durante dos horas. Se indujo el desove con choques térmicos de 27°C a 35°C/30 min, sin observar efectos negativos en la condición de las ostras del stock reproductivo. En la tabla 2 son descritas las diversas actividades desarrolladas durante el bioensayo de inducción al desove.

Espermios y ovocitos

Los machos con respuesta positiva al desove mostraron la característica expulsión de los espermios en forma de hilo blanco. Inmediatamente fueron separados en un recipiente común con fondo negro para mejorar la visualización del esperma; mientras que a las hembras se les dejó en el recipiente principal donde se observó la expulsión de los ovocitos mediante movimientos bruscos de las valvas.

Tanques para el desarrollo larvario y semillas

Luego de comenzar el desove y la expulsión de ovocitos y esperma, se dio inicio el proceso de fecundación externa. En un recipiente que contenía agua de mar a una temperatura de 32-33 °C, salinidad de 35 ‰ y el pH se mantuvo dentro del intervalo 8,2 y 8,4. En este recipiente fue colocada el agua de mar con los ovocitos ya tamizados y los espermios y a continuación se realizaron movimientos ligeros con ayuda de un agitador. Para garantizar altos porcentajes de fecundación que superen el 80 %, el periodo de fecundación fue de una hora. Los ovocitos correspondientes a cada concentración alimenticia (C. Alta y Media) fueron fecundados y colocados por separado en tanques cónicos de 2 TM para el cultivo de larvas, a densidades iniciales de 10 ovocitos/mL. El agua de estos tanques fue previamente filtrada a 1 μm e irradiada con UV. La temperatura varió entre 31 y 32 °C, salinidad de 35 ‰, densidad larvaria aproximada de 10 larvas/mL. Cada tres días fue realizado el cambio del agua de los tanques.

El cultivo larvario duró 15 d, periodo en el cual las larvas alcanzaron la fijación. Para la identificación de los diferentes estadios larvarios se obtuvo una muestra de 10 mL por cada tanque, se colocó 1 gota sobre el portaobjetos y cubreobjetos para ser observados al microscopio. Por otro lado, para observar la vitalidad o comportamiento de las larvas, una muestra de 1 mL fue colocada en un vidrio reloj y observada en un estéreo-microscopio modelo BS-80 Boeco 40X. Durante el desarrollo observado en las larvas, se evidenció una variabilidad en la asimilación alimenticia, lo que probablemente condujo a disparidades en su crecimiento. Aquellas larvas que mostraron una mayor eficiencia en la asimilación de alimento exhibieron un mayor desarrollo, en contraste con las demás. Es importante resaltar que, en el transcurso de este estudio, no se utilizó ningún tipo de antibiótico.

Fijación de juveniles o semillas

Para iniciar el proceso de fijación de presemillas se acondicionaron los tanques semilleros de fibra de vidrio. Estos tanques tienen dimensiones de 1,25 m de ancho x 8 m de largo x 0.90 m de alto y tienen la capacidad de albergar hasta 7 tamices con un diámetro de 45 cm y una porosidad de 200 μm , lo que les permite contener aproximadamente 700.000 presemillas. Además, estos tanques tienen una capacidad de almacenamiento de 3 toneladas de agua.

Antes de introducir las presemillas en el tanque, se realizó un proceso en el que los tamices se dejaron reposar en el agua durante una hora lo que facilitó una fijación exitosa debido a la adaptación de las pre-semillas a su entorno inicial. Una vez que el tanque estuvo listo para la fijación, se tomaron muestras de los tanques semilleros de ambas concentraciones desovadas, que fueron mezcladas en el tanque designado para la fijación. Luego, se continuó con el proceso hasta que las presemillas alcanzaran el tamaño óptimo de 1 cm para su posterior envío al engorde en mar abierto.

Análisis estadístico

La masa húmeda de los tejidos blandos, y los índices de condición y gonadosomático de las ostras alimentadas con las tres concentraciones unialgales se compararon mediante un ANOVA de una vía, después de la verificación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas Levene (Zar 1996). Se utilizó una probabilidad de 0,05 para todos los análisis estadísticos (Boyer *et al.* 1997). En los casos en que se detectaron diferencias, se realizó la prueba *post hoc* de Tukey. Estos resultados se expresaron gráficamente con diagramas de cajas y bigotes, en los que se muestran la mediana, el intervalo de valores y la distribución de los datos y sirvió como una prueba estadística visual no paramétrica. Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHIC Centurion XVI 2009. Starpoint Technologies, Inc.

RESULTADOS

Inducción a la maduración gonádica (6 semanas)

Las masas húmedas totales de las ostras pertenecientes a cada *stock* de reproductores mostraron un incremento sostenido en las 6 primeras semanas y una caída a las 8 semanas (Fig. 2). Esta caída fue equivalente al 1,74 (baja), 10,57 (media) y 14,38% (alta) de la masa húmeda de las ostras. En la gráfica se puede observar que, desde el mismo inicio del bioensayo, las masas de las ostras alimentadas con la dieta de concentración media de alimento mostraron una masa significativamente mayor que las de las concentraciones alta y baja (ANOVA, $F=18,4$, $P\leq 0.05$). Mientras que estas últimas no mostraron diferencias entre sí. Estas diferencias estadísticas se mantuvieron durante todo el bioensayo de maduración gonádica, de los diferentes stocks de reproductores.

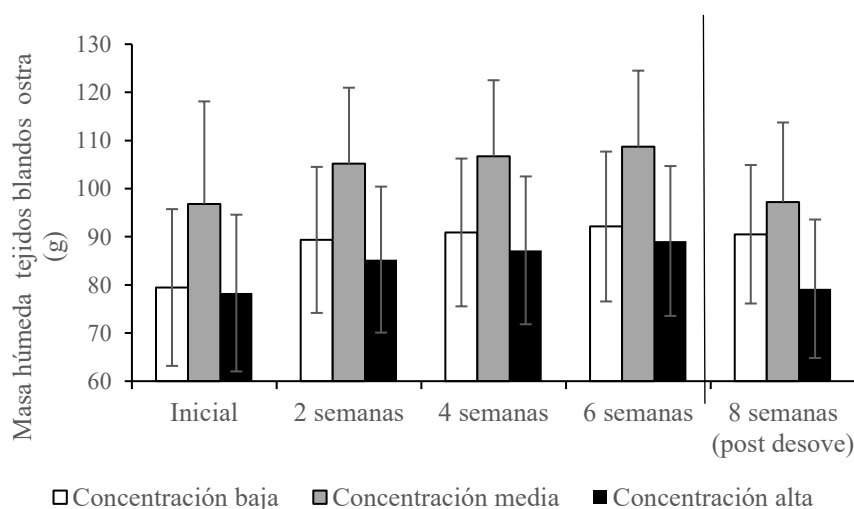


Figura 2. Promedios de la masa húmeda total de individuos de *Magallana gigas*, alimentados con tres diferentes concentraciones unialgales de *Chaetoceros gracilis*. Las líneas verticales indican la desviación estándar (Sd).

Figure 2. Average of total wet mass of *Magallana gigas* individuals fed with three different unialgal concentrations of *Chaetoceros gracilis*. Vertical lines indicate standard deviation (Sd)

Un muestreo previo a la inducción al desove mostró que tanto el índice de condición ($F=7,65$, $P\leq 0,05$), la masa húmeda de la gónada ($F=10,59$, $P\leq 0,05$) (Fig. 3), y el índice gonadosomático ($F=19,90$, $P\leq 0,05$) (Fig. 4) fueron significativamente más altos en los individuos alimentados con la concentración alta de alimento ($1,8\times 10^6$ cél./mL), mientras que no fueron detectadas diferencias significativas entre los tratamientos con concentraciones de alimento media y baja.

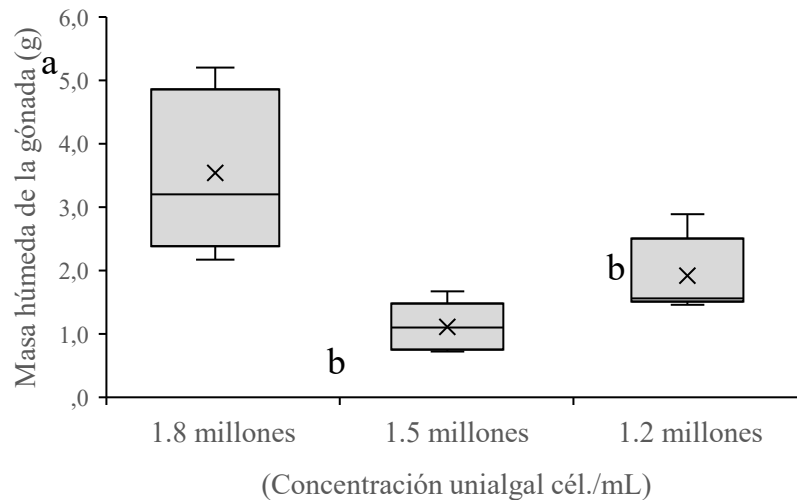


Figura 3. Promedio de la masa húmeda de las gónadas de individuos de *Magallana gigas*, alimentados con tres diferentes concentraciones unialgales de *Chaetoceros gracilis*. Las líneas verticales indican la desviación estándar. Los resultados se expresan gráficamente en diagramas de caja y bigotes y muestran la mediana, el intervalo y la distribución de los datos. Las letras en superíndice idénticas sobre los diagramas denotan la falta de diferencias significativas en $P\leq 0,05$.

Figure 3. Average of gonad wet mass of *Magallana gigas* individuals fed three different unialgal concentrations of *Chaetoceros gracilis*. Vertical lines indicate standard deviation. Results are graphically expressed in box-and-whisker plots and show the median, range, and distribution of the data. Identical superscript letters above the plots denote lack of significant differences at $P\leq 0.05$.

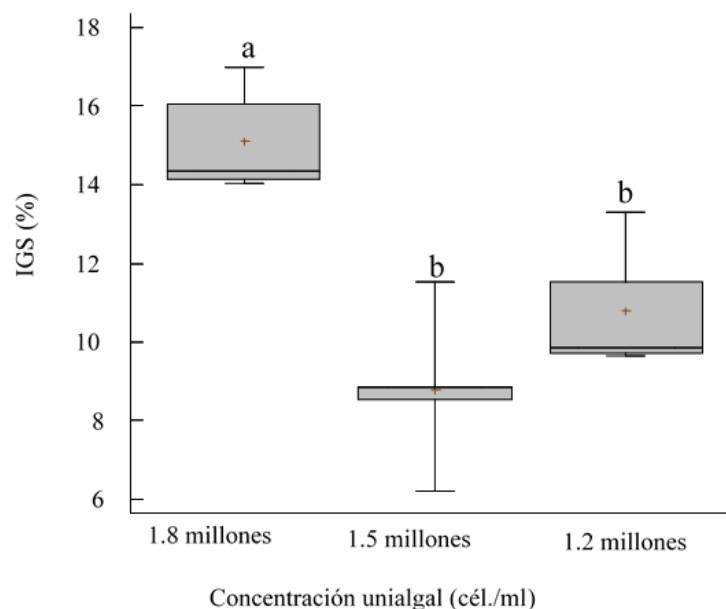


Figura 4. Índice gonadosomático (IGS) de individuos de *Magallana gigas*, alimentados con tres diferentes concentraciones unialgales de *Chaetoceros gracilis*. Los resultados se expresan gráficamente en diagramas de caja y bigotes y muestran la mediana, el intervalo y la distribución de los datos. Las letras en superíndice idénticas sobre los diagramas denotan la falta de diferencias significativas en $P\leq 0,05$.

Figure 4. Gonadosomatic index (GSI) of *Magallana gigas* individuals fed three different unialgal concentrations of *Chaetoceros gracilis*. Results are expressed graphically in box-and-whisker plots and show the median, range, and distribution of the data. Identical superscript letters above the plots denote a lack of significant differences at $P\leq 0,05$.

Inducción al desove

Una vez sometidos los diferentes stocks de reproductores al shock térmico (27 °C - 35°C), en la ración alta de alimento fueron observados un total 15 hembras y 16 machos desovados (64%) del total de 50 individuos desovados (Tabla 2), mientras que, en la concentración media de alimento desovaron un total de 5 hembras y 8 machos para un total del 26% de individuos desovados. En contraste, en la concentración baja de alimento no fueron observados desoves.

Tabla 2: Porcentajes totales de ostras machos y hembras desovados

Table 2: Total percentages of males and females oysters spawned

Concentración del alimento	Número total de individuos	Desovados (n y %)		Total desovados (n y %)
		Machos	Hembras	
Alta	50	16 = 34%	15 = 30%	32 = 64%
Media	50	8 = 16%	5 = 10%	13 = 26%
Baja	50	0 = 0%	0 = 0%	0 = 0%

Tabla 3: Proceso de desove de los reproductores *Magallana gigas*, bajo condiciones de laboratorio controladas.

Table 3: Spawning process of *Magallana gigas* broodstock, under controlled laboratory conditions.

Observaciones previas	Concentración alta	Concentración media	Concentración baja
1 Shock térmico 34-35 °C			
10:30 am	Eliminación de heces	Empezaron a depurar (eliminación de heces y parásitos)	Empezaron a depurar (eliminación de heces, y pseudoheces)
2 Temperatura del agua a 34 °C	Comienzan pequeños movimientos de las valvas	Eliminación de heces y pseudoheces	No hay movimiento, finalizó la depuración
11:00 am	Empezaron movimientos de posible desove, las valvas abiertas	Empezaron movimientos leves, las valvas se empezaron a abrir	Eliminación de heces
3 Temperatura del agua a 33 °C			
11:45 am	Desove de machos	Valvas abiertas con pequeños movimientos	Eliminación de heces
4 Temperatura del agua a 33 °C			
11:55 am	Desove de ♂ y posible ♀	Desove de machos	Eliminación de heces
5 Temperatura del agua a 34 °C			
12:05	Desove de ♀ y ♂ en baldes separados	Desove de hembras y machos en baldes separados	No hay desove, se mantiene la depuración
6 Shock térmico 34-35 °C			
12:30 pm	Finalización de la inducción al desove	Desove continuo	Finalización de la inducción al desove
7 Temperatura del agua a 30 °C			
13: 00 pm	-----	Finalización de la inducción al desove	-----
8 13:30 pm			

En la tabla 3 se muestran el número de hembras y machos que respondieron positivamente a la inducción al desove y sus respectivos porcentajes, tanto por separado, así como en el conjunto de total de ostras alimentados con las tres concentraciones de dieta unialgal (Alta, Media y Baja).

Con respecto al número de ovocitos obtenidos de los desoves, los stocks de reproductores de los tratamientos de las concentraciones altas y medias desovaron un total de 30x10⁶ y 1x10⁶ de ovocitos, respectivamente (Tabla 4), mientras que, el stock de reproductores del tratamiento de concentración baja de alimento no respondió a la inducción al desove.

Tabla 4. Cronología de las diferentes etapas del desarrollo larvario y sus correspondientes niveles de supervivencias, obtenidos con las diferentes concentraciones microalgales.

Table 4. Chronology of the different stages of larval development and their corresponding survival levels, obtained with the different microalgal concentrations.

Tratamientos	N° Total de ovocitos	Supervivencia					
		Trocófora 0-1 d.	Larva D 1-3 d.	Veliger 4-13 d.	Pediveliger 14-15 d.	Fijación 15 d.	Presemillas >15 d.
Concentración alta	30x10 ⁶	71,5%	62%	45%	34%	2.5%	14%
Concentración media	1x10 ⁶	90%	57%	60%	50%	—	—
Concentración baja	—	—	—	—	—	—	—

Descripción resumida de las diferentes etapas del desarrollo larvario

Larva-D: Luego de 18 horas de la fecundación se observó una **larva trocófora activa**, mientras que las primeras **larvas-D o veliger** se visualizaron a las 26 h, evidenciando la presencia del velo para su natación y alimentación y para el día 4 se observa formación del provínculo. **Larvas umbonadas:** en el día 6 fueron observadas con una talla cercana a las 132 y 163 μm , y a partir de los 8 días se empezó a notar la mancha ocular. **Pediveliger (14-15 días 280-300 μm):** Una vez identificado el estadio de pediveliger, se dispuso del sustrato en los tanques de fijación. En este estadio se visualizó que la larva presentaba un movimiento de reptación mediante un “pie” utilizado para la exploración y posterior fijación al sustrato. **Metamorfosis 15 días en adelante:** Una vez preparado el sustrato y después de haber pasado por pediveliger, se realizó un shock térmico bajando la temperatura de manera brusca de 34-35 °C a 28°C, para enfriar las larvas durante 10 min, luego se las colocó dentro del tanque semillero con agua templada, esto ayudó a la estimulación de la larva a adherirse a un sustrato sólido (500 μm), permitiendo una fijación exitosa. **Presemillas 1-3 mm:** En esta etapa fueron observadas la semilla de *M. gigas* a simple vista.

Cultivo intermedio: En esta etapa se mantienen las semillas hasta que su tamaño sea de 1 cm, para dar paso al proceso de preparación de las canastas o linternas para el cultivo en el mar abierto hasta la talla comercial de 7-9 cm.

Cultivo larvario

En cuanto al cultivo larvario, el desarrollo del mismo es representado a través del progreso cronológico de las diferentes etapas del mismo (Fig. 5), desde la etapa de trocófora hasta la fijación larvaria, progreso que solo se logró en su totalidad en las larvas obtenidas a partir del desove del stock de reproductores alimentados con la concentración alta (Tabla 4). A partir de 30×10^6 ovocitos (100%) y luego de haber transcurridos 18 días del cultivo larvario (Fig. 5), fueron obtenidas 750.000 semillas (2.5%), que respondieron a la inducción a su fijación en el sustrato dispuesto para tal fin.

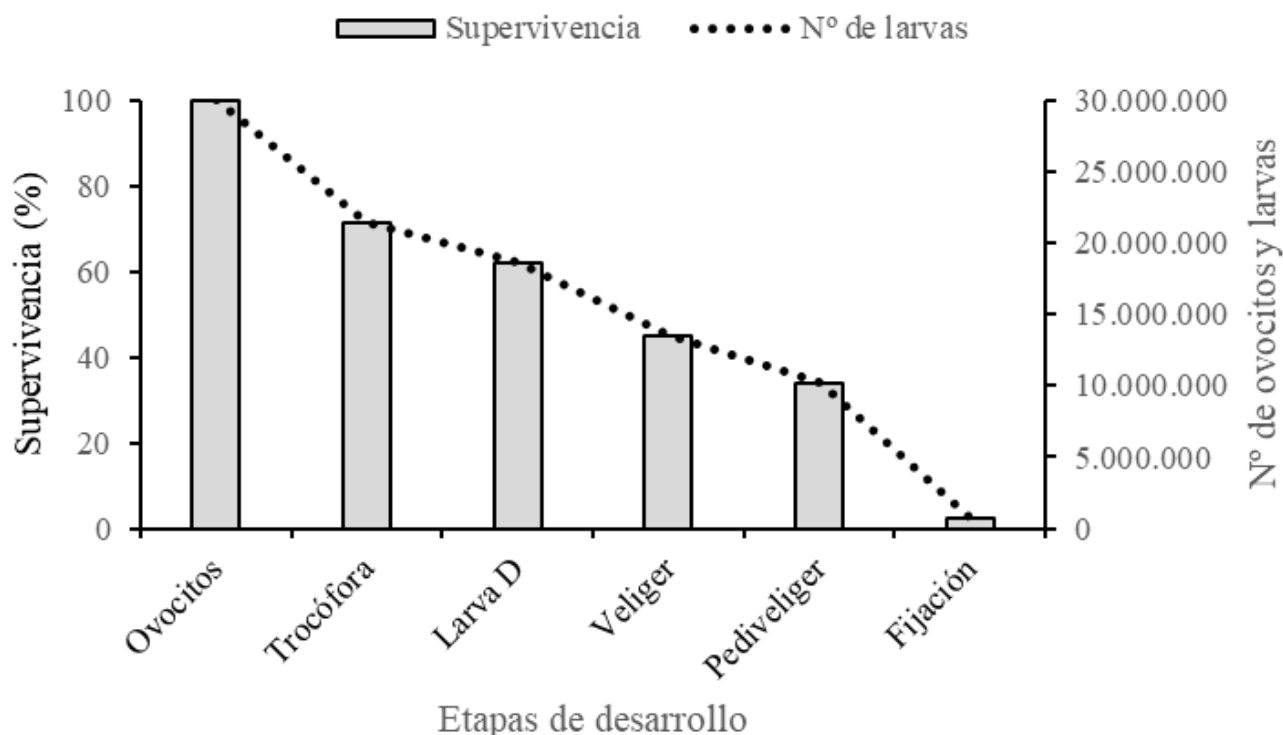


Figura 5. Supervivencia y número de ovocitos y larvas, correspondientes a las diferentes etapas del desarrollo larvario, observados en el cultivo larvario hasta la fijación.

Figure 5. Survival and number of oocytes and larvae, corresponding to the different stages of larval development, observed in larval culture until fixation.

Discusión

Los resultados del presente estudio muestran que las ostras alcanzaron masas húmedas de las gónadas, índice gonadosomático e índice de condición, significativamente más altos en el stock de reproductores alimentados con la concentración alta de la dieta unialgal ($1,8 \times 10^6$ cél./mL). Esta concentración microalgal fue mantenida mediante la adición diaria del volumen necesario para tal fin. Este tipo de alimentación discontinua ha demostrado ser un método eficaz de alimentación semillas de *M. gigas* (Langton y McKay, 1974). En este sentido, varios autores han demostrado que una dieta unialgal cultivada a altas concentraciones llegan a satisfacer los requerimientos nutricionales de los reproductores, garantizando altas cantidades de ovocitos maduros (Berntsson *et al.* 1997, Utting y Millican, 1998). Esta dieta unialgal sería suficiente para incrementar la producción de semillas de *M. gigas*, y además tendría una evidente ventaja en la disminución de los costos invertidos en material fungible, nutrientes, sueldos del personal, electricidad en aireación, iluminación, CO₂, etc.

Estos resultados sugieren que la demanda energética necesaria para la proliferación del tejido reproductivo o gametogénesis fue satisfecha con la concentración de alimento más alta que con las concentraciones medias y bajas de alimento. Estos resultados concuerdan con lo mostrado por Enríquez-Díaz *et al.* (2009) quienes sugieren que la intensidad en el proceso de maduración gonádica estuvo influenciada por la cantidad de alimento disponible. No obstante, y dado que el cultivo y producción de las microalgas es costoso, lo más indicado sería determinar con exactitud la cantidad y calidad de alimento requerido. Existen algunos estudios donde fue demostrado que las diferencias en los ciclos reproductivos de los stocks de reproductores estuvieron asociados a diferencias en la disponibilidad y calidad del alimento (Maurer y Borel 1985, Ruiz *et al.* 1992, Chávez-Villalba *et al.* 2003).

Es notorio que las masas húmedas de los tejidos blandos de las ostras alimentadas con la dieta de concentración media de alimento fueron significativamente más altas, desde el mismo inicio del bioensayo, un resultado que no podría ser atribuido al efecto de la concentración del alimento o al error humano, debido a que los reproductores fueron divididos a simple vista por sus tallas y no por la masa inicial de los mismos. En cuanto a la respuesta a la inducción al desove, también fueron mayores los porcentajes parciales y totales de machos y hembras que respondieron positivamente, cuando fueron alimentados con la dieta de C. Alta (ver tabla 3), confirmando de esa manera los resultados ya descritos para la inducción a la maduración gonádica. Este resultado concuerda con los obtenidos por varios investigadores que mostraron mayores porcentajes de desove y/o de crecimiento en talla de sus correspondientes cultivos larvarios, cuando los stocks reproductivos de ostras fueron alimentados con concentraciones más altas de dietas microalgales (Utting y Millican 1997, Wilson *et al.* 1997, Robert y Gérard 1999), por lo que ha sido establecido que la maduración gonádica de los stocks de reproductores de *M. gigas* requieren grandes cantidades de alimento, y además, que las mismas requieren ciertas cualidades nutricionales del alimento para lograr una gametogénesis completa (Robert y Gérard 1999).

En este sentido, son numerosos los estudios en los que se ha demostrado que pequeñas o grandes variaciones en los factores ambientales influyen de manera importante el crecimiento y la supervivencia de las larvas y postlarvas de *M. gigas*. Entre estos factores se puede citar la temperatura (Helm y Millican 1977, His *et al.* 1989, Rico-Villa *et al.* 2009, Xu *et al.* 2020, Li *et al.* 2022), periodicidad de recambios de agua (Helm y Millican 1977), uso de antibióticos (Helm y Millican 1977, Matsubara *et al.* 2002, Kim *et al.* 2020), salinidad (Helm y Millican 1977, His *et al.* 1989, Rico-Villa *et al.* 2009, Xu *et al.* 2020, Li *et al.* 2022), ración y calidad de alimento (His *et al.* 1989, Rico-Villa *et al.* 2009, Powell *et al.* 2002, Ben Kheder *et al.* 2010), uso de probióticos (Douillet y Langdon, 1994; Kesarcodi-Watson *et al.* 2012), y densidad larvaria (Helm y Millican 1977, Asmani *et al.* 2017, Xu *et al.* 2020, de Oliveira Ramos *et al.* 2021).

Por otro lado, la baja producción de semillas no solo podrían ser atribuidas a la “calidad”, tanto de los reproductores, de los ovocitos y su fertilización, debido a que el “éxito” del cultivo larvario depende de una serie de factores intrínsecos con las técnicas ya establecidas para el cultivo larvario (densidad larvaria, temperatura, salinidad, recambios de agua, dieta, ración del alimento, enfermedades bacterianas, manejo de las larvas, protocolos de asepsia de las instalaciones del laboratorio, entre otros), todos estos aspectos son necesarios y exigen más investigación con el fin de alcanzar la optimización de su producción comercial.

De los tres tratamientos estudiados con la dieta unialgal de *Chaetoceros gracilis* (C. Alta, Media y Baja), solamente fue posible obtener pre-semillas de *M. gigas* con la dieta de concentración alta de alimento, confirmando de manera reiterativa

que este régimen alimenticio se muestra como el más recomendable para la inducción a la gametogénesis y sus subsecuentes etapas de maduración de los gametos, inducción exitosa al desove, y por último, la obtención de pre-semillas de la ostra del Pacífico. Este resultado sin duda aportaría información para el desarrollo de la factibilidad del cultivo comercial de estirpes tropicalizadas de *M. gigas*, en aguas tropicales del Ecuador. Sin embargo, una supervivencia de apenas el 14% (750.000 semillas) indica que falta mucho por hacer para alcanzar la optimización de la producción de semillas necesarias para lograr una producción comercial de la ostra *M. gigas* en las costas de Ecuador. Se recomienda realizar nuevos bioensayos de inducción a la maduración gonádica de la ostra *M. gigas* donde se comparen dietas unialgales con dietas compuestas de dos o más especies de microalgas.

En conclusión, la madurez gonádica, representada por la masa húmeda de las gónadas, índice gonadosomático, porcentaje de reproductores desovados y número de ovocitos significativamente más altos, son evidencia que sugieren que la concentración de $1,8 \times 10^6$ cél./mL de la dieta unialgal de *Chaetoceros gracilis* es la más adecuada para la obtención de semillas de estirpes tropicalizadas de la ostra *M. gigas*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Uso ético de los animales

Todos los procedimientos siguieron los lineamientos de investigación ética y responsable utilizando animales in vivo para experimentos (Kilkenny *et al.*, 2010).

Declaración de contribución de autoría (CRediT)

Estefanía Oña Pérez: Diseño y desarrollo de la investigación, análisis de datos, preparación y edición del manuscrito, consecución de financiamiento para del proyecto de investigación. *Jimmy Villón-Moreno*: Desarrollo de la investigación, análisis de datos, conceptualización de la investigación. *Xavier Vicente Piguave-Preciado*: Desarrollo de la investigación, análisis de datos, conceptualización de la investigación. *Alberto García*: Desarrollo de la investigación, análisis de datos, conceptualización de la investigación. *Luis Freites*: Edición y escritura del manuscrito final, análisis de datos, conceptualización de la investigación.

Agradecimientos

A la prefectura de Santa Elena por brindar su apoyo y confianza durante el desarrollo de este estudio, realizado en el Centro de Reproducción y Cultivo de Ostras, en la provincia de Santa Elena, Comuna El Real, Ecuador, lugar donde fueron desarrolladas los diferentes bioensayos. A la Universidad Estatal Península de Santa Elena y a la Facultad de Biología Marina por el apoyo en la realización del presente estudio.

Referencias

- Adams S. L., Salinas-Flores L., Lim M.H. (2013). Diet conditioning of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, broodstock to improve oocyte cryopreservation success. *Journal of Shellfish Research* 32(2):391-399. <https://doi.org/10.2983/035.032.0219>
- Anjos C., Baptista T., Joaquim S., Mendes S., Matias A.M., Moura P., Matias D. (2017). Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquaculture Research* 48(7):3859-3878. <https://doi.org/10.1111/are.13213>
- Araya R.G., Mingant C., Petton B., Robert R. (2012). Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. *Aquaculture* 364:272-280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.036>

- Argüello-Guevara W., Loor A., Sonnenholzner S. (2013). Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825). *Journal of Shellfish Research* 32(3):665-670. <https://doi.org/10.2983/035.032.0306>
- Asmani K., Petton B., Le Grand J., Mounier J., Robert R., Nicolas J.L. (2017). Determination of stocking density limits for *Crassostrea gigas* larvae reared in flow-through and recirculating aquaculture systems and interaction between larval density and biofilm formation. *Aquatic Living Resources* 30:29. <https://doi.org/10.1051/alr/2017023>
- Barber B.J., Blake N.J. (2006). Reproductive physiology. In: Shumway S.E. Parsons G.J. (eds.). *Scallops: biology, ecology, and aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 357-416. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(06\)80033-5](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(06)80033-5)
- Bayne B.L., Gabbott P.A., Widdows J. (1975). Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55(3):675-689. <https://doi.org/10.1017/S0025315400017343>
- Bayne B.L. (1972). Some effects of stress in the adult on the larval development of *Mytilus edulis*. *Nature* 237:459-459. <https://doi.org/10.1038/237459a0>
- Kheder B., Quéré R., C., Moal J., Robert R. (2010). Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture* 305:165-173. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.022>
- Berntsson K.M., Jonsson P.R., Wängberg S.A., Carlsson A.S. (1997). Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 154(2):139-153. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.022>
- Boyer J.N., Fourqurean J.W., Jones R.D. (1997). Spatial characterization of water quality in Florida Bay and White Water Bay by multivariate analysis: Zones of similar influence (ZSI). *Estuaries* 20:743-758. <https://doi.org/10.2307/1352248>
- 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(1):35-43. <https://doi.org/10.1051/alr:2005003>
- Cardoso C., Gomes R., Rato A., Joaquim S., Machado J., Gonçalves J. F., Afonso C. (2019). Elemental composition and bioaccessibility of farmed oysters (*Crassostrea gigas*) fed different ratios of dietary seaweed and microalgae during broodstock conditioning. *Food Science y Nutrition* 7(8):2495-2504. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1044>
- Chaparro O.R. (1990). Effect of temperature and feeding on conditioning of *Ostrea chilensis* Philippi, 1845 reproducers. *Aquaculture Research* 21(4):399-405.
- Chavez-Villalba J., Mingant C., Cochard J.C., Le Pennec M. (2000). Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* (Paris), 30, 1-12. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1044>
- Chotipuntu P. (2005). Marine diatom (*Chaetoceros calcitrans*) as a monospecies diet for conditioning oyster (*Crassostrea belcheri* Sowerby) broodstock. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)* 2(2):201-207.
- de Oliveira R.C., da Silva F.C., de Miranda Gomes C.H.A., Langdon C., Takano P., Gray M.W., de Melo C.M.R. (2021). Effect of larval density on growth and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a recirculation aquaculture system. *Aquaculture* 540:736667. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736667>
- Delaporte M., Soudant P., Moal J., Kraffe E., Marty Y., Samain J.F. (2005). Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology* 140(4):460-470. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.009>

- Douillet P.A., Langdon C.J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119(1): 25-40. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90441-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90441-3)
- 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* 17:491-506. <https://doi.org/10.1007/s10499-9219-1>
- Farias A., Uriarte I. (2001). Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Shellfish Research* 20(1):97-105.
- Gallager S.M., Mann R., Sasaki G.C. (1986). Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, 56(2), 81-103. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-008-9219-1>
- González-Araya R., Quéau I., Quéré C., Moal J., Robert R. (2011). A physiological and biochemical approach to selecting the ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part A). *Aquaculture Research* 42(5):710-726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02731.x>
- Helm M.M., Millican P.F. (1977). Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11(1) :1-12. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90149-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90149-1)
- Helm M.M., Bourne N., Lovatelli A. (2004). Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 2004. 177p.
- Helm M., Holland D.L., Stephenson R.R. (1973). The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 53:673-684. <https://doi.org/10.1017/S0025315400058872>
- Hendriks I. E., van Duren L.A., Herman P.M. (2003). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296(2):199-213. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00323-X)
- His E., Robert R., Dinét A. (1989). Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 100:455-463. <https://doi.org/10.1007/BF00394822>
- Holland D.L., Spencer B.E. (1973). Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 53:287-298. <https://doi.org/10.1017/S002531540002227X>
- Jonsson N., Jonsson B., Hansen L.P. (1991). Energetic cost of spawning in male and female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Biology* 39(5):739-744. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb04403.x>
- Kesarcodi-Watson A., Miner P., Nicolas J.L., Robert R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344:29-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.029>
- Kim H.J., Jun J.W., Giri S.S., Kim S.G., Kim S.W., Kwon J., Park S.C. (2020). Bacteriophage cocktail for the prevention of multiple-antibiotic-resistant and mono-phage-resistant *Vibrio coralliilyticus* infection in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Pathogens* 9(10):831. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100831>
- Kraeuter J.N., Castagna M., van Dessel R. (1982). Egg size and larval survival of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Argopecten irradians* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 56:3-8. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(81\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(81)90003-4)

- Langton R.W., McKay G. U. (1974). The effect of continuous versus discontinuous feeding on the growth of hatchery reared spat of *Crassostrea gigas* Thunberg. *ICES Journal of Marine Science* 35(3):361-363. <https://doi.org/10.1093/icesjms/35.3.361>
- Lannan J.E., Robinson A. Breese W.P. (1980). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture* 21:337-345. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90068-X)
- Li,Y., Xu C., Li Q. (2022). Effects of salinity and temperature on growth and survival of diploid and tetraploid larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 550:737809. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737809>
- Lodeiros C., Márquez A., Revilla J., Rodríguez D., Sonnenholzner S. (2017). Spat production of the rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825). *Journal of Shellfish Research* 36(3):729-735. <https://doi.org/10.2983/035.036.0322>
- Matsubara D., Tanaka M., Soumyou Y., Hirakawa K., Doi R., Nakai T. (2002). Therapeutic effects of antimicrobial compounds against bacillary necrosis of larval Pacific oyster. *Fish Pathology* 37(4):183-188. <https://doi.org/10.3147/jsfp.37.183>
- Maurer D., Borel M. (1985). Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arachon: comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. In *VI Congrès de la Société Française de Malacologie et Colloque "Contamination, intoxication et perturbation des mollusques marins"*.
- Mazón-Suástegui J.M. (2005). Biología y cultivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* Sowerby ii, 1842 (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Mazón-Suástegui J.M., Leyva-Miranda G.A., Arrieche-Galíndez D., Lodeiros-Seijo C., López-Carvallo J.A. (2019). Influence of hatchery rich-carbohydrate diet on the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) farming. *Aquaculture Research* 50(10):3078- <https://doi.org/3081>. 10.1111/are.14263
- Mercer M., Gennari L., Lovatelli A. (2024). Pacific oyster farming – A practical manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Papers, No. 696. Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/cc9396en>.
- Muranaka MS., Lannan J.E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39:217-228. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90267-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90267-9)
- Powell E.N., Bochenek E. A., Klinck J. M., Hofmann E.E. (2002). Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture* 210, 89–117. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00891-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00891-2)
- Rico-Villa B., Pouvreau S., Robert R. (2009). Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287(3-4) :395-401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.054>
- Robert R., Gérard A. (1999). Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*, 12(2), 121-130. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80021-7)
- Ruiz C., Abad M., Sedano F., Garcia-Martin L.O., Lopez J. S. (1992). Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 155(2):249-262. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90066-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90066-J)
- Utting S.D., Millican P.F. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155(1-4):45-54. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00108-7)

- Utting S.D., Millican P.F. (1998). The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165(3-4):167-178. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00268-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00268-3)
- Wilson J. A., Chaparro O.R., Thompson R.J. (1996). The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture* 139(1-2):63-75.
- Xu C., Li Q., Chong J. (2020). Combined effect of temperature, salinity, and rearing density on the larval growth of the black shell strain and wild population of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture International* 28:335-347. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00465-4>

