

Inducción al desove de la Concha Prieta *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en condiciones de laboratorio

Induction of spawning of the mangrove cockle *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) under laboratory conditions

Biolg. Roberto Retamales-González PhD.

Consultor, docente de la Escuela de Ingeniería en Acuicultura y Pesquerías
roretamales@gmail.com
rretamales@utm.edu.ec

Lcdo. Patricio Panta Vélez Mg.

Docente de la Escuela de Ingeniería en Acuicultura y Pesquerías
rpanta@utm.edu.ec

José Vélez-Cárdenas

Consultor

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue inducir el desove de la *Anadara tuberculosa* mediante la disminución y aumento de salinidad en condiciones de laboratorio. Los reproductores de estos moluscos se recolectaron en el sitio San Felipe, del cantón San Vicente, en octubre de 2012. Se describe el desarrollo embrionario y larvario de este molusco, obteniendo larva tipo D entre las 16 y 18 horas después del desove. Durante los 17 días del cultivo larvario, las larvas fueron alimentadas con una mezcla de microalgas de *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*, logrando una tasa de crecimiento de 4,755 $\mu\text{m}/\text{día}$. El desarrollo embrionario y larvario de la *A. tuberculosa* es semejante a las otras especies de moluscos bivalvos. La contaminación por protozoarios y bacteriana fue uno de los principales factores de mortalidad de las larvas, limitando la fase final del cultivo larvario.

Palabras clave: *Anadara tuberculosa*, desarrollo embrionario, cultivo larval, crecimiento, salinidad.

ABSTRACT

The aim of this research was to induce the spawning of *Anadara tuberculosa* by decreasing and increasing the salinity in laboratory conditions. The broodstock of these molluscs were collected in San Felipe, San Vicente in October 2012. The research shows (?) the embryonic and larval development of the molluscs obtaining larvae type D between 16 and 18 hours after spawning. In the larval culture, the larvae were fed a mixture of microalgae, *Chaetoceros gracilis* and *Isochrysis galbana*, during 17 days of culturing, achieving a growth rate of 4,755 $\mu\text{m}/\text{day}$. The embryonic and larval development of *A. tuberculosa* was similar to other species of bivalve molluscs. The pollution by protozoans and bacteria was one of the principal factors of mortality of the larvae, limiting the final phase of the larval culture.

Key words: *Anadara tuberculosa*, embryonic development, larviculture, growth, salinity.



Recibido: 9 de abril, 2014
Aceptado: 24 de abril, 2014

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura de moluscos bivalvos representa una alternativa económicamente viable y ambientalmente sostenible debido a la posibilidad de operación a gran escala, contribuyendo en la reducción del esfuerzo pesquero en la zona costera (Pipitone *et al.*, 2000).

Anadara tuberculosa es un molusco bivalvo que habita fondos lodosos de los manglares desde Baja California hasta Perú (Keen, 1971), siendo una especie de un recurso económico y de subsistencia importante para las poblaciones costeras.

La inducción al desove es trascendental para la producción de semillas de moluscos bivalvos en laboratorios e involucra el control de los tiempos de reproducción de los individuos con el fin de obtener el máximo valor de fertilización (Helm *et al.*, 2006). Para aplicar métodos de inducción, tales como cambios de temperatura y salinidad, es importante comprobar que el organismo se encuentre en óptimas condiciones fisiológicas, con la finalidad de que los huevos y larvas presenten los mejores índices de viabilidad (Loor, 2012).

Existen muchos estímulos para inducir al desove en los moluscos bivalvos, entre ellos están los físicos como cambios de temperatura y salinidad; los mecánicos como la exposición al aire libre previo al desove, el incremento de la concentración de partículas (alimento) suspendidas en el agua y el producido por medio de choques eléctricos; los químicos como la adición en el agua de cloruro de potasio, peróxido de hidrógeno y la inyección de monoaminas como serotonina, dopamina y norepinefrina, o la inyección de esteroides sexuales, y por último los estímulos biológicos, como la introducción de extractos de gónadas maduras en el agua. Todos ellos son objeto de investigaciones con la finalidad de establecer

el método que sea más efectivo para inducir al desove (Velasco, 2008).

En ambientes naturales, los cambios de salinidad al igual que los de temperatura producen desoves en bivalvos de zonas tropicales y templadas (Stuardo y Martínez, 1974; Parwadani, 2011), causadas principalmente por stress osmótico (Fong *et al.*, 1995). Estudios de inducción en laboratorio mediante cambios de salinidad en *Rangia cuneata*, *Crassostrea virginica* y *Geukensia demissa* han dado resultados positivos (Nava y García, 2010).

El objetivo de la presente investigación fue inducir al desove a *A. tuberculosa* a través de cambios de salinidad en condiciones de laboratorio y así obtener huevos y larvas viables para el cultivo controlado y la posterior repoblación de los hábitats naturales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Calidad del agua

Durante el cultivo, el agua dulce y de mar utilizada, se desinfectó físicamente mediante filtración a través de un bolso de celulosa de 5 μm y químicamente con la aplicación de cloro (Hipoclorito de sodio 10 ppm), recirculación del agua por 24 horas con la ayuda de una bomba sumergible y posterior neutralización con tiosulfato de sodio (10 ppm).

2.2. Obtención de los reproductores

Los reproductores de *A. tuberculosa* se recolectaron en el sitio San Felipe, del cantón San Vicente, en octubre de 2012, y fueron trasladados en una caja térmica a los laboratorios de cultivo.

2.3. Acondicionamiento y maduración de los reproductores

En el laboratorio, los organismos fueron lavados con abundante agua dulce filtrada y tratada para eliminar el sedimento y la epifauna (epibiontes e incrustantes) adherida a sus valvas. Luego se realizó un análisis biométrico individual para determinar la talla (mm) y peso (g).

Los reproductores (n= 50) con longitud total promedio de $52,24 \pm 1,53$ mm y peso total promedio de $42,27 \pm 4,06$ g fueron colocados en un tanque de fibra de vidrio de color negro (2,45 m largo, 0,90 m ancho y 0,40 m altura) con 300 litros de agua de mar filtrada y tratada, con temperatura promedio de $24,60 \pm 0,26$ °C, oxígeno disuelto promedio de $5,25 \pm 0,23$ mg/L, salinidad promedio de $32,39 \pm 0,19$ ups, con recambio de agua del 100 % diario durante el acondicionamiento y maduración de los reproductores y alimentados con una ración diaria de 100 litros de *Chaetoceros gracilis* (concentración promedio de $1,03 \times 10^6 \pm 3,45 \times 10^5$ cel/ml) y 100 litros de *Isochrysis galbana* (concentración promedio de $1,96 \times 10^6 \pm 7,42 \times 10^5$ cel/ml),

2.4. Inducción al desove

La inducción al desove se realizó mediante cambios de salinidad, colocando a los reproductores en un tanque de 100 litros con agua dulce a 0 ups durante 60 minutos; con exposición de los organismos a desecación por 30 minutos, y posteriormente en agua salada con 32 ups durante 60 minutos.

Cuando los organismos comenzaron a desovar, se dejó aproximadamente 1 hora para que terminaran de expulsar la mayor parte de sus gametos y se produjera la fecundación. Los espermatozoides y ovocitos se mezclaron mediante agitación suave.

Después de la fertilización, se procedió a filtrar los huevos fecundados a través de un tamiz de 30 μ m con la finalidad de eliminar el exceso de espermatozoides para evitar la poliespermia.

2.5. Desarrollo embrionario y cultivo larval

El desarrollo embrionario y larvario se llevó a cabo en tanques de fibra de vidrio de 300 L, con agua de mar filtrada, tratada y con aireación suave.

Al día siguiente, después de la fecundación, se filtró el agua del tanque de cultivo utilizando varios tamices con ojo de malla de 30, 60 y 100 μ m. para desechar los residuos de huevos no fertilizados y larvas trocófora muertas. Las larvas tipo D quedaron retenidas en el tamiz de 30 μ m y posteriormente fueron trasladadas a un tanque de fibra de vidrio de 300 L. Se describió el desarrollo embrionario y larvario de *A. tuberculosa* hasta el final del cultivo mediante observación al microscopio.

2.6. Alimentación larvaria

Se proporcionó la primera alimentación en el estadio de larva D en base a una mezcla de microalgas de pequeño tamaño celular como *Chaetoceros gracilis* (2 L) e *Isochrysis galbana* (2L), a una concentración de $1,35 \times 10^4$ y $2,25 \times 10^4$ células/ml, respectivamente. En los siguientes días se agregó 500 ml de microalgas de cada especie hasta el final del cultivo.

2.7. Parámetros físico - químicos del agua

Datos de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad se registraron diariamente a las 08:30 y 16:00, utilizando un equipo multiparámetros portátil marca YSI 550 A® y un refractómetro marca VEE GEE, modelo STX-3®, respectivamente.

2.8. Crecimiento larvario

La tasa de crecimiento diario se obtuvo utilizando la ecuación de Gulland (1983):

$$TCA = (Lt_2 - Lt_1) / (T_2 - T_1)$$

Donde Lt_1 y Lt_2 son las mediciones de longitud total en los instantes de tiempo T_1 y T_2 respectivamente.

Se utilizó un sistema cerrado de suministro de agua a temperatura ambiente por medio de filtro de grava y arena para reutilizar el agua de los tanques de mantenimiento de reproductores y cría larvaria, y reducir el tratamiento químico de la misma. El agua salobre (8 ups para aclimatación de reproductores y 12 ups para cría larvaria) se obtuvo de la mezcla de agua dulce con agua salada. El agua dulce o salada utilizada se desinfectó físicamente mediante filtración, a través de un bolso de celulosa de 5 μm y químicamente con la aplicación de cloro (10 ppm), recirculación del agua por 24 horas, con la ayuda de una bomba sumergible, y posterior neutralización con tiosulfato de sodio (10 ppm).

3. RESULTADOS

3.1. Desarrollo embrionario y larval

Una hora después del desove, se observó huevos fecundados ($\varnothing \approx 60 \mu\text{m}$), la formación del cuerpo polar y la primera y segunda división celular (donde el huevo fecundado se divide en dos células desiguales (Fig. 1a)). A las dos horas, se visualizó huevos en la cuarta división celular y algunas en estadio de mórula temprana (Fig. 1b). El huevo en fase de blástula y gástrulas fue observado a partir de las cuatro horas posteriores al desove. En esta fase, se da inicio a la aparición de los primeros cilios, con movimientos leves y

giros sobre su propio eje y natación no definida (Fig. 1c); posteriormente aparece el flagelo apical y el embrión presenta alta motilidad con giros sobre su propio eje y de traslación (Fig. 1d).

La larva trocófora sin flagelo apical, se observó a las siete horas luego del desove. En esta fase se detallan los cilios con mayor grosor, con una natación muy activa, rotando sobre su mismo eje y con forma triangular (Fig. 1e, f).

Entre las 10 y 12 horas, comienza a formarse la concha en la larva trocófora y empieza a acomodar sus penachos de cilios. Se dispone a transformarse en Larva "D" por lo que se encuentra en transición a esta fase. Sigue presentando gran motilidad (Fig. 1g, h).

La aparición de la larva "D" se observó entre las 16 y 18 horas. En esta fase, ellas acomodan los cilios de manera tal que sus movimientos, les permiten generar una corriente de agua que succione el alimento hasta su boca, para alimentarse, por lo que ya se visualiza alimento en su sistema digestivo y se observa una charnela recta (Fig. 1i).

Durante el desarrollo larvario, al octavo día, se tornó visible el umbo, con una longitud promedio de $121,09 \pm 5,55 \mu\text{m}$ (Fig. 1j). Al día 16, después de la fecundación, se observó la presencia de la mancha ocular, con una longitud promedio de la concha de $193,08 \pm 7,72 \mu\text{m}$ (Fig. 1k).

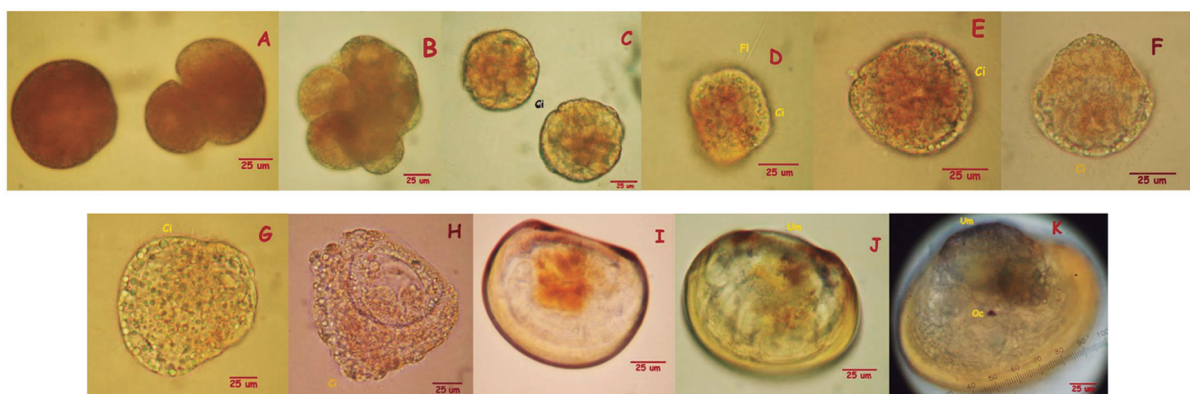


Figura 1. Desarrollo Embrionario y Larval de *A. tuberculosa*. A: huevos fecundados; B: células en división; C: huevo fases de gástrula con los primeros cilios; D: Embrión con flagelo apical; E y F: Larva trocófora con forma triangular; G y H: Transformación de la larva trocófora en larva D; I: Larva D con charnela recta; J: Larva D con umbo; K: Larva D con mancha ocular. Fl: Flagelo; Ci: Cilios; Um: Umbo; Oc: Mancha ocular.

3.2. Alimentación Larvaria

Desde el estadio Larva D (día 2) hasta el día 9, la concentración de algas se mantuvo constante en un promedio de $1,83 \times 10^4 \pm 5,05 \times 10^3$

y $3,71 \times 10^4 \pm 9,32 \times 10^3$ de *C. gracilis* e *I. galbana*, respectivamente. Posteriormente hasta el día 15 del cultivo se observó un aumento en la concentración de algas y disminución en los días 16 a 17 de cultivo, (Fig. 2).

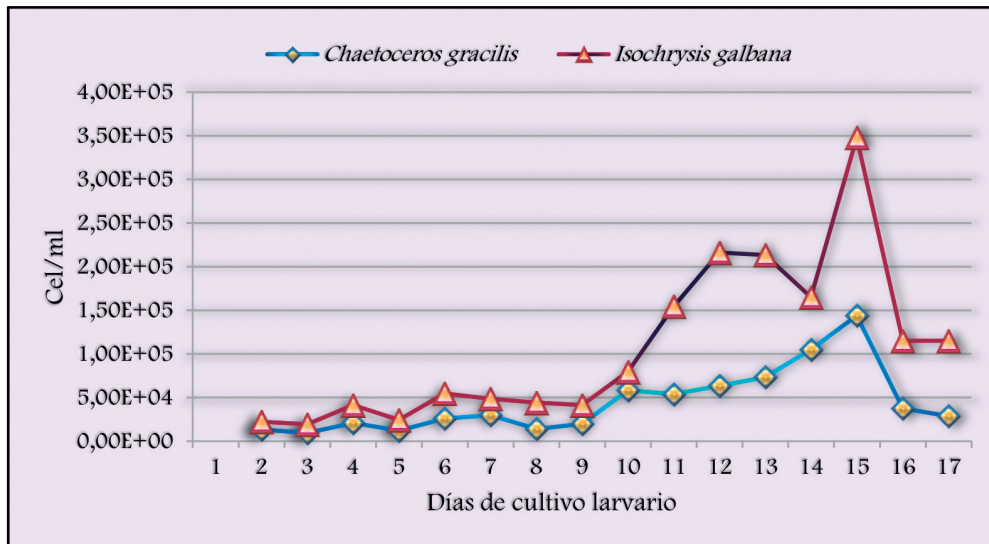


Figura 2. Concentración promedio de *C. gracilis* e *I. galbana* (cel/mL) en relación a días de cultivo larvario de *A. tuberculosa*.

3.3. Parámetros físico - químicos del agua

Durante el cultivo larvario, la temperatura varió entre 22,35 °C y 25,45 °C con un promedio de $24,67 \pm 0,22$ °C; el oxígeno disuelto promedio estuvo en $5,06 \pm 0,25$ mg/L con un mínimo de

3,90 mg/L y 5,75 mg/L como máximo y salinidad promedio de $32,06 \pm 0,25$ con datos mínimo de 31 ups y máximo de 33 ups (Tabla 1). En la Figura 3, se visualizan promedios diarios de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad durante el cultivo larvario de *A. tuberculosa*.

Tabla 1. Parámetros físico – químicos del agua del tanque donde se cultivaron las larvas de *A. tuberculosa* durante días de cultivo larvario.

Parámetro	n	Promedio ($\pm 2SE$)	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	18	24,67 (0,22)	23,45	25,25
Oxígeno Disuelto (mg/L)	18	5,06 (0,25)	3,90	5,75
Salinidad (ups)	18	32,06 (0,25)	31,00	33,00

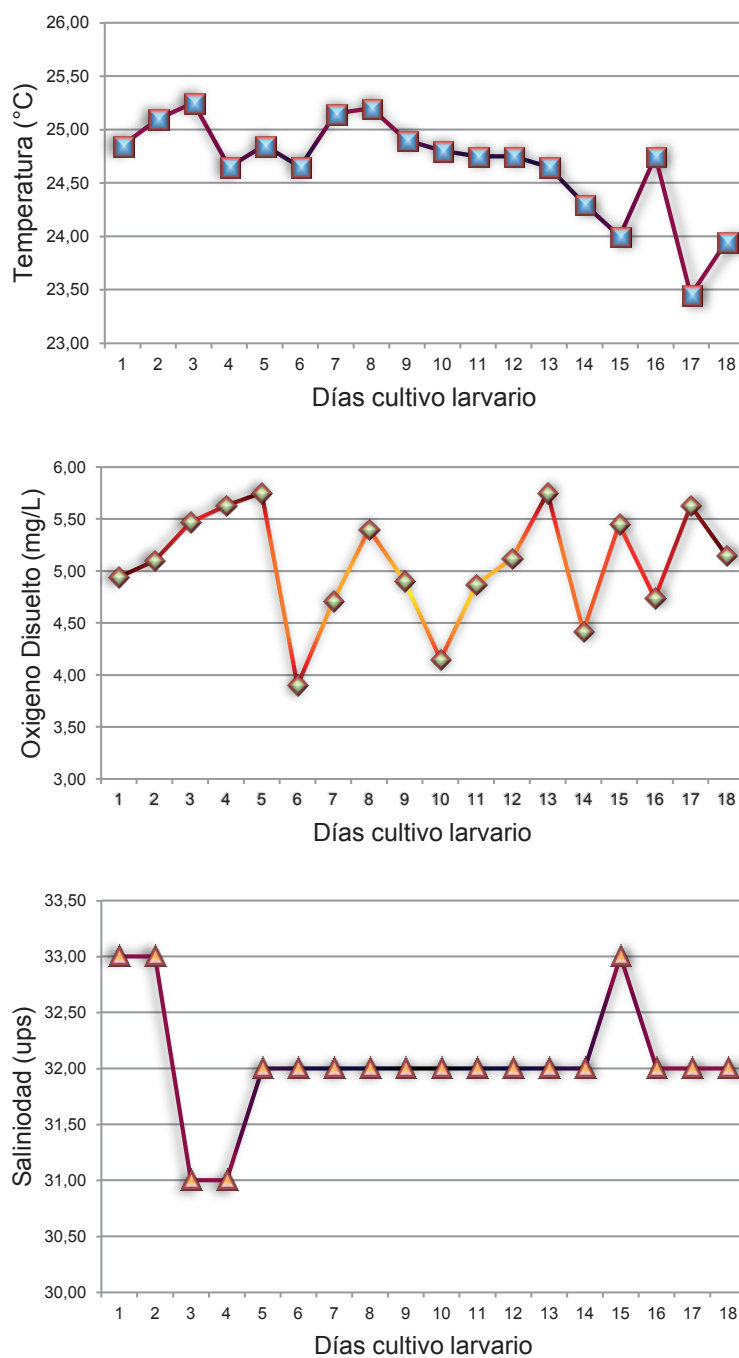


Figura 3. Promedios diarios de temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L) y salinidad (ups) del agua del tanque de cultivo de larvas de *A. tuberculosa*.

3.4. Crecimiento Larvario

En la Figura 4 se visualiza el crecimiento larvario de *A. tuberculosa* en laboratorio, iniciando el cultivo con una larva D con longitud total promedio, de

93,57±4,42 μm y obteniendo después de 17 días de cultivo una larva en etapa de pre-asentamiento de 210± 7,14 μm de longitud total promedio con una tasa de crecimiento promediable de 4,755 μm/día.

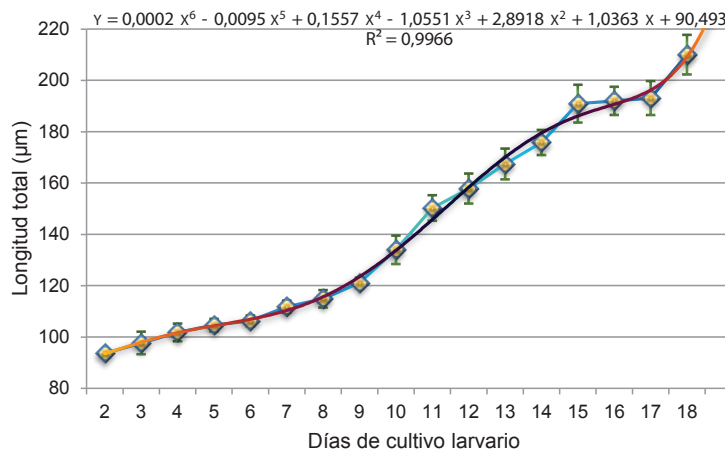


Figura 4. Crecimiento larvario de *A. tuberculosa* en laboratorio.

4. DISCUSIÓN

La inducción al desove de moluscos bivalvos por efecto de cambios en la salinidad del agua de cultivo, ha dado buenos resultados en laboratorio, por lo que *A. tuberculosa* no fue la excepción. Asimismo, los efectos de este parámetro sobre los mecanismos reproductivos de moluscos bivalvos se ha enfocado en la viabilidad de larvas y adultos y en los datos geográficos relacionados con la distribución de las concentraciones salinas (Nava y García de Severeyn, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio, disminuyendo la salinidad de 32 a 0 ups y aumentándola luego a 32 ups, podrían coincidir o ser aproximados a los obtenidos por García (1984), quien a pesar de no reportar valores de desove, utilizó los cambios de salinidad en *Polymesoda arctata*, logrando desove en el laboratorio y obteniendo gametos y embriones viables, permitiendo fertilizaciones y etapas larvales del ciclo de vida de esta especie. También, García de Severeyn *et al.*, (1994), lograron inducir altos desoves en *Polymesoda sólida*, variando la salinidad de 0 a 35 ups, y así describir el ciclo embrionario y larval de esta especie

El desarrollo embrionario y larvario en moluscos, es semejante en todas las especies de bivalvos. *A. tuberculosa*, refleja similitudes de forma general con *Tivela mactroides* (Reverol *et al.*, 2004), *Semele solida* (Cisnero y Bautista, 2006), *Chione cancellata* (Rengel *et al.*, 2010) y *Crassostrea iridescens* (Loor, 2012), pero puede diferir en alguno de los estadios. En este estudio el desarrollo embrionario de *A. tuberculosa* se

completó en 15 horas, logrando larva D entre las 16 y 18 horas y logrando observar la mancha ocular de las larvas a los 16 días después de la fertilización. En *T. mactroides* el embrión se desarrolló en 5 horas y el ciclo de larvas duró 22 días (Reverol *et al.*, 2004). *C. cancellata* completa su desarrollo embrionario entre 18 y 19 horas, obteniendo larvas D en 20 horas después de la fecundación y el estadio de pediveliger se observó a los 22 días (Rengel *et al.*, 2010). En *C. iridescens* (Loor, 2012) obtuvo larvas D entre las 22 y 24 horas, observándose la mancha ocular en el día 25, completando su ciclo larvario en el día 35, cuando logró larvas asentadas posteriores al desove. Las diferencias entre estas especies de bivalvos pueden ser debidas a características taxonómicas y factores ecológicos (García de Severeyn *et al.*, 1994).

Utting y Spencer (1991) establecen que la cantidad, calidad y combinación de microalgas suministradas a larvas de moluscos, durante el desarrollo larval, repercute en la supervivencia de las larvas.

Las larvas de moluscos bivalvos alimentadas con dos o más tipos de microalgas tienen mayor crecimiento y supervivencia que al suministrar un solo tipo, debido a la complementariedad de nutrientes que se logra al suministrar la mezcla (Narvarte y Pascual, 2001; Helm *et al.*, 2006; Bayne, 2008; Velasco y Barros, 2008). Walne (1970) y Helm *et al.*, (2006) indican que una mezcla de microalgas de alto valor nutritivo que incluya un flagelado y una diatomea de tamaño adecuado invariablemente acelera la tasa de crecimiento y desarrollo larvario en los bivalvos.

La tasa de crecimiento de las larvas de *A. tuberculosa* no se vio afectada por la concentración y mezcla de microalgas utilizadas en este estudio. Esta mezcla de microalgas fue ratificada con el crecimiento obtenido en las larvas de *A. tuberculosa* utilizando *C. gracilis* e *I. galbana*, asegurando una nutrición más completa y balanceada (Carreño *et al.*, 2012). Las variaciones de las concentraciones algales durante los días de cultivo, tanto el incremento de las mismas, podría ser explicado por la mortalidad de las larvas en esos días, lo que disminuye el consumo de éstas y asimismo su descenso al final del cultivo como consecuencia del aumento de la tasa de filtración

de organismos de mayor tamaño.

La contaminación por protozoarios y bacteriana fue uno de los principales factores que provocó la mortalidad de las larvas, limitando la fase final del cultivo larvario de *A. tuberculosa* debido a las condiciones desfavorables de calidad de agua en el laboratorio. Igual situación ocurrió en *C. madrasensis* (Samuel, 1983), *Tivela mactroides* (Reverol, *et al.*, 2004) y *C. iridescens* (Loor, 2012) donde este último manifiesta que los altos porcentajes de mortalidad registrados en la larvicultura de este molusco bivalvo, especialmente a partir del día 7, pudo deberse a la presencia de gran cantidad de protozoarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bayne, B. L. 2008.** Physiological ecology of marine molluscan larvae. 299-343. En: Verdonk, N. H. van den, J. A. M. Biggelaar y A. Tompa (Eds.). The Mollusca, Vol III. Development. Academic Press, Nueva York. 258 p.
- Carreño, Y.; Acosta, E. y Gómez-León, J. 2012.** Crecimiento y supervivencia de larvas de *Argopecten nucleus* alimentadas con diferentes dietas microalgales. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras, Vol. 41 (1) 103-120.
- Cieneros, R. y Bautista, J. 2006.** Acondicionamiento y Reproducción de la almeja *Semele solida* (Gray, 1828) en ambiente controlado. En: V Seminario Virtual de las Ciencias del Mar – OANNES.
- Fong, P.; Kyojuka, K.; Duncan, J.; Rynkowski, S.; Mekasha, D. y Ram, J. 1995.** The Effect of Salinity and Temperature on Spawning and Fertilization in the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) from North America. Biol. Bull. 189: 320-329.
- García de Severeyn, Y. 1984.** Biología y Ecología de *Polymesoda arctata* (Deshayes, 1854), almeja presente en el Lago de Maracaibo. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo (Venezuela). 25 pp.
- García de Severeyn, Y.; Severeyn, H. y Ewald, J. 1994.** Early development of the estuarine mollusks *Polymesoda solida* (Philippi, 1946) (Bivalvia: Corbiculidae) in Lake Maracaibo, Venezuela. Amer. Malacol. Bull. 11: 51-56.
- Gulland, J. A. 1983.** Fish stock assessment: a manual of basic methods. FAO/Wiley series on food and agriculture. Wiley Interscience, Chichester, Reino Unido. 223p
- Helm, M.; Bourne, N. y Lovatelli, A. 2006.** Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento Técnico de Pesca FAO, 471, Roma. 182 p.
- Keen, M. 1971.** Sea Shells of Tropical West América. Marine Mollusks from Baja California to Perú. Stanford University Press, Stanford; California. Second edition
- Loor, A. 2012.** Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). Tesis de grado previa a la obtención del título de Biólogo. ESPOL. Ecuador. 115p.
- Nava, D. y García de Severeyn, Y. 2010.** Desove inducido en moluscos bivalvos del sistema de Maracaibo. Ciencia 18(3): 153-164.
- Narvarte, M. A. y Pascual, M. S. 2001.** Diet trial on tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* (d'Orb) larvae. Aquacult. Internat., 9:127-131.
- Parwadani, L. 2011.** Review: Spawning Induction in Bivalve. Journal Penelitian Sains. Volume 14 Nomer 2(D) 14207: 33-36.
- Pipitone, C.; Badalamenti, F.; D'anna, G. y Patti, B. 2000.** Fish biomass increase after a four-year trawl ban in the Gulf of Castellammare (NW Sicily, Mediterranean Sea). Fish. Res. 48: 23-30.
- Rengel, J.; Guelmelit, L.; Torres, L. y Holuis Marin, C. 2010.** Inducción al Desove y Desarrollo Larval del Molusco Bivalvo *Chione cancellata*. Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 62, 475-480.
- Reverol, Y.; Delgado, J.; De Severeyn, Y.; Severeyn, H. 2004.** Embryonic and larval development of the marine clam *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae) in Zulia State, Venezuela. Rev. Biol. Trop., 52(4): 903-909.
- Samuel, D. 1983.** Early larval development of Edible oyster *Crassostrea madrasensis* (Perston). Proc. Symp. Coastal Aquaculture, 2: 483-487
- Stuardo, J. y Martínez, A. 1974.** 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. 45 pp.
- Utting, S.D. y Spencer, B.E. 1991.** The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles, Laboratory Leaflet Number 68.
- Velasco, L. 2008.** Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. UNIMAGDALENA, Primera Edición.
- Velasco, L. y Barros, J. 2008.** Experimental larval culture of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture Res., 39: 603-618.
- Walne, P. R. 1970.** Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Helgoländer wiss. Meeresunters., 20: 514-525

Agradecimientos.

Los autores agradecen a Ermen Moncayo, Ana Macay y Paola García, estudiantes de la carrera por su ayuda en esta investigación.