

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Desarrollo larval y sustratos energéticos de la almeja mano de
león *Nodipecten subnodosus***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Gabriel Enrique Nava Gómez

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por
Gabriel Enrique Nava Gómez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Zaúl García Ezquivel
Codirector de tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dra. Diana Tentori Santa Cruz



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Gabriel Enrique Nava Gómez © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Gabriel Enrique Nava Gómez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Desarrollo larval y sustratos energéticos de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*

Resumen aprobado por:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirectora de tesis

Dr. Zaúl García Esquivel
Codirector de tesis

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es uno de los pectínidos con mayor potencial acuícola en México debido a la alta demanda del musculo aductor o “callo” en mercados internacionales, por su concha en el mercado artesanal, así como por su corto ciclo de vida. A pesar de ello, actualmente no se tiene estandarizada una biotecnología de cultivo en laboratorio. Los trabajos disponibles muestran una baja reproducibilidad en el rendimiento larval bajo condiciones de laboratorio, y se desconocen hasta ahora los patrones de acumulación de reservas energéticas. En este estudio se realizaron 2 experimentos con 4 lotes larvales independientes con el fin de estandarizar una metodología de producción de cultivo en sistema de tandas (lotes 1-3) y conocer los patrones de acumulación de reservas energéticas (proteínas, lípidos y carbohidratos totales) en los diferentes estadios de desarrollo (lote 4). Se utilizaron tanques de fibra de vidrio de fondo cónico (500 L) por triplicado, densidad inicial de 5 larvas/mL, 27 ± 1 °C de temperatura y una concentración de 15 cél/ μ L de las microalgas *I. galbana* (clon T-ISO) y *Pavlova pinguis* (relación 1:1). En ambos experimentos se observaron tasas lineales de crecimiento y supervivencia. Durante el primer experimento se observaron porcentajes de supervivencia al día 10 de cultivo de entre 11 y 22%, y tasas de crecimiento de entre 5.5 a 7.8 μ m/día, sin diferencias estadísticamente significativas entre lotes larvales para ambos casos, y una talla promedio de asentamiento de 207 ± 3 μ m. El segundo experimento mostró que las proteínas son el sustrato energético más abundante durante todo el desarrollo larval y se mantienen relativamente constantes (47-56%). Los lípidos totales aumentaron hacia el final del desarrollo larval (larva “D” $26.5\pm 1.1\%$, pediveliger $38.6\pm 2.3\%$), y los carbohidratos fueron el constituyente menor (9-11%) siendo relativamente constantes durante el desarrollo. El estudio mostró que el desarrollo larval de *N. subnodosus* bajo las condiciones de cultivo utilizadas fue reproducible y la metodología podría ser aplicada a escala comercial. Por otra parte, se presume que las proteínas cumplen una función estructural a diferencia de los lípidos, los cuales serían la principal fuente de energía endógena durante la metamorfosis.

Palabras clave: *Nodipecten subnodosus*, desarrollo larval, composición bioquímica, sustratos energéticos

Abstract of the thesis presented by **Gabriel Enrique Nava Gómez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Larval development and energy substrates of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*

Abstract approved by:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Thesis Director

Dr. Zaúl García Esquivel
Thesis Director

The lion's paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, is one of the most important pectinids with aquaculture potential in Mexico, due to the high demand of his adductor muscle in international markets, its short life cycle, and the price of the shell in the craft market. In spite of this, current protocols for larval production under hatchery conditions have not been standardized. Available studies indicate that there is still a low reproducibility in the performance of different larval batches under laboratory conditions, and the temporal patterns of energy storage for these stages are still unknown. In this study two different experiments were carried out with four independent larval batches in order to: a) standardize a batch culture methodology for *N. subnodosus* larvae (batches 1-3), and b) document the energy patterns (proteins, lipids and total carbohydrates) exhibited by *N. subnodosus* during their larval life (batch 4). Larvae were reared in triplicate cylindrical cone-bottom fiberglass tanks (500 L) at an initial density of 5 larvae/mL, temperature of 27 ± 1 °C, and a concentration of 15 cell/ μ L of a 1:1 mixture of the microalgae *I. galbana* (clone T-ISO) and *Pavlova pinguis*. Linear patterns of shell growth rate and cumulative survival were observed in both experiments. Survival percent during after ten days ranged between 11 and 22%, and growth rates between 5.5 to 7.8 μ m/day. No significant differences were found among larval batches for both variables. Pediveligers were observed when larvae attained an average shell height of 207 ± 3 μ m. The second experiment showed that proteins were the most abundant energy substrate, remaining relatively constant (56-47%) throughout the larval period. In contrast, total lipids increased towards the end of the larval period (straight hinge $26.5 \pm 1.1\%$, pediveliger $38.6 \pm 2.3\%$) while carbohydrates were a minor constituent that remained relatively constant (9-11%). Overall, this study showed that the culture conditions used for batch culture of *N. subnodosus* was reproducible and this methodology may be successfully applied on a commercial scale. Besides, it is presumed that proteins fulfill a structural function while lipids are mainly accumulated during larval development to serve as the main endogenous source of energy during the metamorphosis.

Key words: *Nodipecten subnodosus*, larval development, biochemical composition, energy substrates

Dedicatoria

Para mí, el tiempo es algo invaluable.

El tiempo no sabe esperar,
no hace excepciones
ni entiende de pretextos.

No hay quien no se ajuste a su paso.

Y aun conociendo el poder que
posee el tiempo sobre la vida,
me encontré con personas que no dudaron
en darme un minuto de su preciado tesoro,
de su preciado tiempo.

Esto es para ellos...

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al departamento de Acuicultura por permitirme realizar mi maestría.

A la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en especial al Laboratorio de Biotecnología de Moluscos.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, una persona entregada a su profesión y siempre con la mejor disposición. Por sus consejos, sabiduría, paciencia y sobre todo por aceptar ser parte de mi formación académica. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Zaúl García Ezquivel, el claro ejemplo del trabajo y disciplina. ¡Muchas gracias por la confianza a lo largo de estos años!

A la Dra. Mónica Hernández y la Dra. Diana Tentori. Les agradezco mucho su disposición. El tiempo es oro, muchas gracias por compartirlo conmigo.

Al Oc. Dahren L. Gómez Togo, por facilitar los organismos reproductores que permitieron desarrollar esta investigación, por su interés en el desarrollo biotecnológico de esta especie, y por permitirme vivir la experiencia de visitar su increíble área de trabajo. ¡Te lo agradezco Dahren!

A todos los integrantes del departamento de Acuicultura, que de una forma u otra contribuyeron en este trabajo.

A mis compañeros de maestría. Rosita, Melina, Doris, Yira, Ranferi, Patricio, Leonardo. Me llevo muchas experiencias gratas y de aprendizaje. ¡De aquí hasta el éxito amigos!

A mis padres Beatriz y Gabriel. No tengo palabras. Solo el sentimiento de agradecimiento y amor infinito.

A mi gemela, Betita. ¡Mi acuicultora favorita! ¡Sabes que empecé en la acuicultura por ti!

A mi hermanito gigante, Rafa. ¡Gracias por hacerme ver la gentileza hecha persona!

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.1.1. Generalidades de <i>N. subnodosus</i>	2
1.1.2. Distribución.....	3
1.1.3. Pesquería de <i>N. subnodosus</i>	3
1.1.4. Investigación acuícola de <i>N. subnodosus</i>	3
1.1.5. Sustratos energéticos y desarrollo larval.....	4
1.2. Justificación.....	6
1.3. Hipótesis nulas.....	6
1.4. Objetivos.....	7
1.4.1. Objetivo general.....	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1. Mantenimiento de organismos.....	8
2.2. Desove y mantenimiento de larvas.....	9
2.3. Cuantificación de variables.....	10
2.3.1. Lote larval 1-3.....	10
2.3.2. Lote larval 4.....	11
2.4. Esquema de muestreo.....	12
2.5. Determinación de peso seco, proteínas, lípidos y carbohidratos.....	12
2.5.1. Peso seco total (PST) y orgánico (PO).....	12
2.5.2. Análisis de proteínas.....	13
2.5.3. Cuantificación de lípidos.....	13

2.5.4. Cuantificación de carbohidratos.....	14
2.6. Análisis estadístico.....	14
Capítulo 3. Resultados.....	15
3.1. Desarrollo larval.....	15
3.2. Lote larval 1-3.....	16
3.2.1. Supervivencia y crecimiento larval.....	16
3.3. Lote larval 4.....	20
3.3.1. Supervivencia y crecimiento larval.....	20
3.3.2. Cambios temporales en la cantidad de sustratos energéticos.....	21
Capítulo 4. Discusión.....	22
4.1. Desarrollo larval.....	22
4.2. Crecimiento y supervivencia.....	23
4.3. Sustratos energéticos.....	26
Capítulo 5. Conclusiones.....	30
Literatura citada.....	31

Lista de figuras

Figura		Página
1	Área de procedencia de los organismos reproductores de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> . (Tomado de Google Earth Pro).....	8
2	Estadios de desarrollo larval de <i>N. subnodosus</i> . A) Estadio larva "D"; B) Estadio larva umbonada temprana; C) Estadio larva umbonada tardía; Estadio larva pedivéliger; Barra de escala = 40 μm	15
3	Supervivencia acumulada y altura de la concha de larvas de <i>N. subnodosus</i> de lotes larvales 1, 2 y 3. A) Cambios temporales en la supervivencia acumulada (%) de <i>N. subnodosus</i> . B) Cambios temporales en la altura de la concha (μm) de larvas de <i>N. subnodosus</i> . ☆) Datos de seguimiento adicional de Lote 1. Las barras representan error estándar.....	17
4	Supervivencia acumulada (%) y altura promedio de la concha (μm) de lote larval 4. Las barras representan error estándar. Las líneas y ecuaciones de ajuste de altura de la concha contra la edad y supervivencia acumulada contra la edad también se muestran.....	19
5	Composición bruta de sustratos energéticos (con base en el peso orgánico) de larvas de <i>N. subnodosus</i> a lo largo del desarrollo larval. Las barras representan el error estándar. Los índices indican las diferencias estadísticamente significativas entre el mismo sustrato energético. *Charnela recta; **Umbonada temprana; ***Umbonada tardía; ****Pedivéliger.....	20

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones de cultivo iniciales y días en los que se realizó recambio de agua y mantenimiento de los 4 lotes larvales de <i>N. subnodosus</i>	9
2	Edad (días después de la fertilización, DDF) y estadio larval al momento de la toma de muestra para determinación de las reservas energéticas de larvas de <i>N. subnodosus</i>	12
3	Ecuaciones de ajuste lineal de supervivencia larval por día de <i>N. subnodosus</i> vs edad en días (E) de tres lotes larvales diferentes. El coeficiente de determinación (R^2) y el valor de P del análisis de comparación de pendientes (ANCOVA) también se muestran.....	18
4	Ecuaciones de ajuste lineal de altura de la concha de <i>N. subnodosus</i> vs edad en días (E) de tres lotes larvales diferentes. El coeficiente de determinación (R^2) y el valor de P del análisis de comparación de pendientes (ANCOVA) también se muestran.....	18
5	Comparación de tasas de crecimiento, supervivencia y diferentes condiciones de cultivo de larvas del género <i>Nodipecten</i> de diversos estudios. LI=Lote larval; AI=Altura inicial; R=Replicas; T=Temperatura de cultivo; DI=Densidad inicial; TM=Talla de metamorfosis; S=Supervivencia; SD=Sin Datos; AF=Agua de mar filtrada; AP=Agua de mar pasteurizada; ADP=Agua de mar tomada de un pozo de playa; AS=Agua de mar sintética; APC=Agua de mar con probiótico comercial. CCAL= <i>Chaetoceros calcitrans</i> ; CG= <i>Chaetoceros gracilis</i> ; CM= <i>Chaetoceros muelleri</i> ; ML= <i>Monochrysis lutheri</i> ; PP= <i>Pavlova pinguis</i> ; PS= <i>Pavlova salina</i> ; TISO= <i>Isochrysis galbana</i>	25
6	Contenido porcentual de sustratos energéticos (%) de larvas de charnela recta ("D") y pediveliger de distintas especies de pectínidos. Los porcentajes están expresados en función del peso orgánico (PO) o peso seco (PS) de los organismos.....	29

Capítulo 1. Introducción

Uno de los principales desafíos que enfrentará la población mundial será el cómo lograr la seguridad alimentaria de más de 9,000 millones de personas que se estima vivirán para el año 2050 (FAO, 2016). En este contexto, la utilización de recursos naturales provenientes de la pesca y la acuicultura, dos actividades importantes generadoras de alimento para consumo humano, serán de vital importancia para satisfacer la creciente demanda de alimento (FAO, 2016). Históricamente, el suministro mundial de productos marinos para consumo humano ha sido cubierto en mayor parte por la pesca y complementado por el aporte del sector acuícola, sin embargo, en 2014, la contribución del sector acuícola fue por primera vez mayor a la pesca, esto debido en gran parte al incremento de especies cultivadas (FAO, 2016).

En 2016 la producción de los principales grupos de especies procedentes de acuicultura continental, marina y costera (sin incluir macroalgas) fue de 80 millones de toneladas, siendo los moluscos el segundo lugar en producción (22 %) solo superado por los peces (68 %) (FAO, 2018). Dentro de los moluscos, el grupo de mayor contribución lo conforman los bivalvos con una producción acuícola superior a los 17 millones de toneladas anuales. Este volumen de producción está constituido principalmente por diversas especies de ostras, almejas, mejillones y pectínidos, siendo China el mayor productor de moluscos bivalvos, aportando más del 80 % de la producción mundial (FAO, 2018).

En México, la producción de moluscos bivalvos superó las 57 mil toneladas en el año 2013, ocupando el cuarto lugar en América Latina siendo superado por países como Chile, Brasil y Perú. Actualmente esta industria ha sido desarrollada mayormente en los estados de Veracruz, Tabasco, Baja California y Baja California Sur (CONAPESCA, 2013) centrándose principalmente en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y, en menor proporción, en el ostión de placer *C. corteziensis*, el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, la almeja catarina *Argopecten ventricosus* y la ostra perlera *Pteria sterna*. Otras especies de moluscos bivalvos que poseen importancia comercial son la almeja voladora *Pecten vogdesi*, la almeja pismo *Tivela stultorum*, la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa*, el callo de hacha *Atrina maura*, la almeja chocolate *Megapitaria squalida* y la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Félix-Pico *et al.*, 1989; Maeda-Martínez, 2008).

La almeja mano de león *N. subnodosus* es una de las especies más grandes de la familia Pectinidae llegando a alcanzar longitudes de hasta 215 mm y un peso de hasta 1.8 kg incluyendo la concha (Reinecke, 1981), además posee un “callo” o músculo aductor de hasta 250 g, siendo este de gran aceptación tanto en mercados nacionales como internacionales, donde es catalogado como un producto de calidad gourmet (Osuna-García, 2006). Sin embargo, a pesar de que el cultivo larvario de esta especie se ha realizado y

estudiado desde los años noventa, su producción no ha sido constante a través del tiempo y las investigaciones se han centrado más en las etapas de pre-engorda y engorda en mar abierto (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011) y, por ende, los estudios referentes al desarrollo larval son limitados, por lo que es fundamental abordar los diferentes aspectos que inciden en su desarrollo, siendo el aspecto nutricional uno de los más importantes.

La supervivencia y desarrollo de los estadios larvales iniciales, y previos a la etapa de metamorfosis, dependen en gran parte de la alimentación, específicamente de la acumulación de reservas energéticas que son metabolizadas para poder llevar a cabo la intensa actividad morfo genética que conlleva su desarrollo (Bayne, 1972; Da Costa *et al.*, 2011), es por ello que se requiere conocer el comportamiento de estas reservas en el desarrollo temprano de *N. subnodosus* para poder conocer cuáles son las condiciones alimentarias ideales para obtener un mejor rendimiento larval.

Las investigaciones orientadas al desarrollo larval de esta especie y los diversos factores que inciden en su cultivo larvario son escasos, por lo que la falta de conocimientos sobre esta etapa del ciclo de vida de la especie puede ser una limitante para los proyectos a escala piloto-comercial y comercial, que son necesarios para impulsar la producción acuícola de la almeja mano de león.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades de *N. subnodosus*

N. subnodosus es un molusco bivalvo que recibe nombres comunes de acuerdo a la región geográfica de donde son extraídas, por lo cual son también llamadas “almeja mano de león” y “garra de león”, entre otros. En México es considerada como una de las especies de almejas con mayor importancia acuícola, esto debido a que en 1 año de cultivo presenta una tasa de crecimiento de hasta 6.9 cm de longitud de la concha (Arellano-Martínez *et al.*, 2011). En todos los pectínidos, el musculo aductor (callo) es la parte del cuerpo más preciada y comercializada, aunque también existe una demanda por las conchas de colores vivos, por lo que se les considera como un subproducto importante (Ponce-Díaz *et al.*, 2011).

1.1.2 Distribución

N. subnodosus presenta una distribución desde la Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur y parte del Golfo de California, México, hasta las costas de Perú en el Océano Pacífico (Keen, 1971), aunque la presencia de bancos comerciales solo se ha registrado en las zonas de Laguna Guerrero Negro y Laguna Ojo de Liebre, B.C. Sur (INAPESCA, 2012).

1.1.3 Pesquería de *N. subnodosus*

El aprovechamiento de los bancos comerciales requiere de una evaluación poblacional y opinión técnica por parte del Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA), si la evaluación es positiva, la extracción se lleva a cabo mediante buceo. Esta institución, determinó que la talla mínima de captura de sería de 150 mm de longitud de la concha (INAPESCA, 2012), sin embargo, los análisis posteriores de las poblaciones, permitieron fijar la talla mínima en 140 mm y una cuota anual, por arriba de la talla mínima de captura, de máximo el 30% de la población.

Debido a la calidad y al tamaño del musculo aductor de *N. subnodosus*, las pesquerías tuvieron un incremento constante hasta el año 2009, donde se registró su máxima cuota de captura con poco más de 320 t de callo. No obstante, a partir de 2011 las pesquerías tuvieron una importante disminución debido a diversos factores; uno de ellos fue la mortalidad masiva que se reportó por pescadores en la Laguna Ojo de Liebre, la cual afecto a casi el 40 % de la población total (Massó-Rojas *et al.*, 2014).

1.1.4 Investigación acuícola de *N. subnodosus*

Para la producción de semillas de moluscos bivalvos se utilizan frecuentemente dos metodologías; la captación de semillas del medio natural mediante recolectores con algún tipo de sustrato y la producción larval intensiva en laboratorios (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). En el caso de *N. subnodosus*, la captación de semillas del medio natural ha sido evaluada en la Laguna Ojo de Liebre y Bahía Concepción, B.C. Sur, México, y se concluyó que esta es casi nula (García-Domínguez *et al.*, 1992; Félix-Pico *et al.*, 1999; Narvarte *et al.*, 2001), debido a esto, la alternativa de la producción larval intensiva parece ser la más prometedora.

Las investigaciones del desarrollo larval de *N. subnodosus* se realizaron por primera vez en el Instituto Tecnológico de Monterrey-Guaymas, Sonora, posteriormente en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), también en el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011) y por último, en la empresa Acuicultura Robles S.P.R de R.I en La Paz, B.C. Sur; esta empresa realizó la producción de 200,000 semillas para evaluar su crecimiento en la Bahía de La Paz, B.C.S. (M. Robles, 2018, com. pers).

Actualmente, el único centro de investigación que se encuentra activamente trabajando en el desarrollo larval de esta especie es el IIO de la UABC, que realizó la entrega de 600,000 semillas en 2017 y 380,000 más en 2018, a través de un proyecto de vinculación con un permisionario del cultivo de esta especie (ANUIES, 2017), además, se estableció un proyecto por parte de UABC y del Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) con el fin de conocer el acervo genético e implementar las bases de un programa futuro de repoblamiento (CONACyT, 2017).

1.1.5 Sustratos energéticos y desarrollo larval

Los principales factores que pueden influenciar en gran parte el crecimiento, supervivencia y desarrollo larval de los moluscos bivalvos, producidos bajo condiciones de laboratorio, incluyendo a *N. subnodosus* son, entre otros, la temperatura, el tipo de sistema de cultivo, la densidad de organismos (Cerón-Ortíz, 2006) y la alimentación (Diarte-Plata, 2007).

Las microalgas vivas son el principal alimento en todas las etapas de desarrollo de los moluscos bivalvos, por lo tanto, la selección de microalgas, con un adecuado contenido nutricional es de vital importancia en los laboratorios de producción (Duerr *et al.*, 1998). En ciertas especies de pectínidos, la mayor parte de las dietas microalgales incluyen más de una especie (Farías-Molina, 2001), esto es debido a que el valor nutricional de especies individuales de microalgas pueden no cumplir totalmente con los requerimientos nutricionales de la larva, con los sustratos energéticos de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, e incluso carotenoides, por lo cual el complementar una dieta con más de una especie de microalga asegura, en la mayoría de los casos, una mejor alimentación (Sühnel y Lagreze-Squella, 2016).

Dentro de los diferentes sustratos energéticos, los lípidos tienen un papel importante en el desarrollo larvario de moluscos bivalvos ya que son requeridos en funciones celulares, bioquímicas y fisiológicas (Farías-Molina, 2001). Tal es su importancia, que los lípidos son utilizados como un indicador de la calidad larval, principalmente debido a que son fuente de energía (triglicéridos) y al contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Pernet *et al.*, 2003). Cabe destacar que la habilidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados *de novo* en moluscos bivalvos es nula o muy limitada (Chu y Greaves, 1991), por lo cual es de vital importancia incluir en su dieta especies de microalgas con altos valores de estos componentes, para asegurar un mejor desarrollo de las especies cultivadas. Millán (1997), reportó que en larvas de *A. ventricosus* se presentó un mayor crecimiento cuando se utilizó como alimento la mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, que cuando se proporcionaron por separado, esto debido principalmente a que estas especies contienen los ácidos grasos esenciales DHA y EPA, respectivamente.

Las proteínas tienen un papel estructural y energético en invertebrados marinos (Holland, 1978) y junto con los lípidos son la principal fuente de energía endógena que utilizan las larvas de ostión durante la metamorfosis (His y Maurer, 1988; Labarta *et al.*, 1999, García-Esquivel *et al.*, 2001). Para el caso de pectínidos no parece haber un patrón único de acumulación de reservas durante el desarrollo larval. Así, en larvas de *Argopecten purpuratus* sus reservas nutricionales de proteínas aumentan en las primeras etapas de desarrollo, mientras que los lípidos y carbohidratos se mantienen o disminuyen al aproximarse la metamorfosis (Farías *et al.*, 1998), algo que contrasta con lo observado en *Patinopecten yessoensis*, donde los tres macronutrientes disminuyeron conforme se aproxima la etapa de metamorfosis. (Whyte *et al.*, 1987).

Por otra parte, algunos autores mencionan que el papel que juegan los carbohidratos en el metabolismo larval es mínimo (Gallager *et al.*, 1986), mientras que Whyte *et al.* (1989) sugieren que cumplen una función importante en el balance de nutrientes para sintetizar tejido nuevo, esto debido al ahorro de proteína y ácidos grasos como fuente de energía. Farías *et al.* (1998) y Whyte *et al.* (1987) reportaron que las larvas de *A. purpuratus* y *P. yessoensis*, mantuvieron un porcentaje de acumulación de carbohidratos más bajo (1-12 %), del total de reservas energéticas en la etapa larval, pero que éstos llegaban a ser mayores que los lípidos una vez que superaban la etapa de metamorfosis.

En el caso de *N. subnodosus*, la producción continua de larvas y semillas de buena calidad es limitada, debido en gran parte al poco conocimiento sobre los requerimientos ambientales y nutricionales los cuales inciden en los diferentes estadios de desarrollo (Maeda-Martínez, 2008; Cerón-Ortíz *et al.*, 2009). Por lo

anterior, es importante aportar conocimiento que permita lograr un mejor desempeño de las etapas larvales.

1.2 Justificación

La acuicultura representa actualmente una alternativa ante la demanda creciente de alimento por el aumento de la población mundial, en este sentido, la almeja *N. subnodosus* presenta características que la colocan como una especie con un alto potencial acuícola, dada su tasa de crecimiento rápida y su alto valor económico, debido a estas características se produjo una sobreexplotación de los bancos naturales, de tal forma que la especie esta en veda desde la década anterior. Sin embargo, esta medida no ha logrado influir significativamente en el aumento de la población natural ni tampoco se ha logrado un dominio de la tecnología de cultivo en el laboratorio o el campo. Los trabajos disponibles hasta la fecha reportan avances importantes pero incompletos en la comprensión de la biología y el cultivo de la especie. Lo anterior se ha traducido en un lento desarrollo de su tecnología de cultivo, la cual debe ser replicable y eficiente en términos de supervivencia, crecimiento, y calidad bioquímica. Debido a lo anterior, este trabajo tiene como objetivo evaluar el rendimiento de diversos lotes larvales, procedentes de diferentes desoves para conocer la reproducibilidad del cultivo larvario de *N. subnodosus* en un sistema estático, además de cuantificar el contenido de reservas energéticas en las diferentes etapas larvales. La información generada en este trabajo no solo permitirá conocer la replicabilidad del sistema de cultivo en tanques cilindro-cónicos a nivel piloto, sino también se obtendrá información sobre los patrones de acumulación y utilización de los macronutrientes durante el crecimiento larval de *N. subnodosus*.

1.3 Hipótesis

El crecimiento y la supervivencia de *Nodipecten subnodosus*, cultivadas en sistema estático, es similar entre lotes larvales, procedentes de diferentes desoves.

El patrón de acumulación de reservas energéticas de larvas de *Nodipecten subnodosus* cultivadas en sistema estático es similar al de otras especies de pectínidos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el desarrollo larval de *Nodipecten subnodosus* en sistema de cultivo estático para conocer su rendimiento en condiciones de laboratorio.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento y supervivencia de larvas de *Nodipecten subnodosus* procedentes de diferentes desoves.
- Valorar el contenido de sustratos energéticos (proteínas, carbohidratos y lípidos totales) de *Nodipecten subnodosus* durante el desarrollo larval.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Mantenimiento de organismos

Diferentes lotes de organismos adultos de *N. subnodosus*, provenientes de Bahía de las Ánimas, Baja California, México (Figura 1), fueron llevados al laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California en Ensenada, B.C., México. Los organismos se mantuvieron en un sistema de recirculación de 1,400 L a temperatura constante (22 ± 1 °C), con recambios diarios del 100% y fueron alimentados con una mezcla de las microalgas *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros calcitrans* y *Pavlova pinguis* (relación 1:1:1). Los organismos fueron examinados visualmente una vez a la semana para conocer el estado de maduración gonádica (Ramírez-Castillo, 2003). Una vez que la mayoría de los organismos alcanzaron la madurez gonádica, estos fueron inducidos al desove.

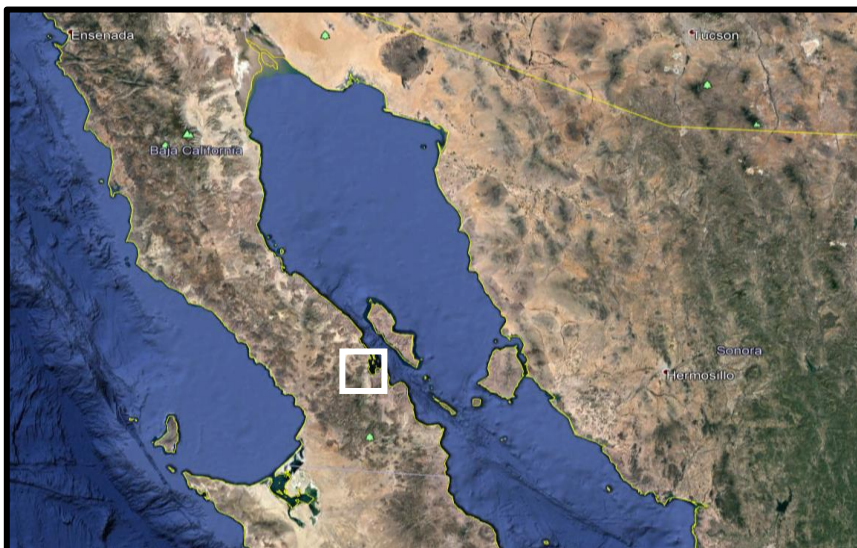


Figura 1.- Área de procedencia de los organismos reproductores de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. El recuadro indica Bahía de las Ánimas, B.C. México. (Tomado de Google Earth Pro).

2.2 Desove y mantenimiento de larvas

Cuatro diferentes desoves se llevaron a cabo en fechas separadas. Los tres primeros desoves (Experimento 1) fueron usados para evaluar la replicabilidad del desempeño (crecimiento y supervivencia) de *N. subnodosus* en sistemas de cultivo estáticos, mientras que el último desove (Experimento 2) se utilizó para evaluar los cambios temporales en la cantidad de sustratos energéticos presentes en las larvas de *N. subnodosus*.

Para realizar el desove, los adultos se colocaron en una charola (100 x 60 x 15 cm), la inducción se realizó con tratamiento térmico, con ciclos de 30 min de exposición a temperatura del agua de 19 °C y posterior sustitución por temperatura caliente (29 °C), por un tiempo similar al anterior (Helm *et al.*, 2006). Una vez que los organismos iniciaban la liberación de gametos, los óvulos y espermatozoides se recolectaron en recipientes separados para evitar su auto fertilización. Posteriormente los óvulos fueron concentrados en un volumen de 15 L, se tomaron alícuotas de 1 mL (por triplicado) y se contabilizaron en una cámara de conteo Sedgewick-Rafter. La fertilización se llevó a cabo usando una relación óvulo: espermatozoides de 5:1 (Z. García-Esquivel, 2017, com. pers.). Después de 1 h los óvulos fueron incubados en tanques de fibra de vidrio cilindro-cónicos de 500 L, a una densidad de 10 óvulos/mL, temperatura de 27±1°C y aireación moderada. Al día siguiente las larvas obtenidas se cuantificaron, se colocaron en los mismos tanques, por triplicado. El cálculo del porcentaje de eclosión de cada lote larval se obtuvo cuantificando el total de óvulos fertilizados que se colocaron en los tanques de incubación y el total de larvas recuperadas 24 horas posteriores.

Las condiciones iniciales de cultivo como densidad y temperatura se establecieron con base en lo reportado anteriormente por García-Pámanes *et al.* (2011). Las condiciones de cultivo restantes, como la alimentación (ración y especies de microalgas), tratamiento del agua de cultivo y la frecuencia de muestreo fueron establecidas con base en diversos lotes larvales desarrollados anteriormente en el laboratorio de Biotecnología de moluscos del IIO-UABC.

Se utilizó una densidad de cultivo de 5 larvas/mL. Se realizaron recambios de agua del 100% cada tercer día, y se aprovechó para realizar la cuantificación de larvas totales presentes en cada tanque con el fin de estimar la supervivencia acumulada. Durante los recambios de agua, se concentró las larvas en tamices con diversa luz de malla y se descartó aquel porcentaje que presentó menor crecimiento que la mayoría. Las larvas fueron alimentadas con las microalgas *Isochrysis* sp. y *Pavlova pinguis* con una ración diaria de 15 cél./μL. Diariamente o cada segundo día se cuantificó la concentración de microalgas presente en los

tanques y se adicionó más alimento para mantener la concentración de 15 cél/ μ L establecida. Esto se llevó a cabo mediante un contador de partículas Multisizer™ 3 Coulter Counter®. Durante el desarrollo larval se tomaron muestras de cada tanque con el fin de evaluar el crecimiento (descrito en el apartado 2.4. Durante el desarrollo de todos los lotes larvales, se utilizó agua de mar filtrada a 1 μ m y previamente ozonificada 15 horas antes de ser usada, a una concentración de 0.3 mg/L de O₃.

2.3 Cuantificación de variables

2.3.1 Lote larval 1-3

En cada fecha de muestreo se tomaron muestras de la columna de agua de cada uno de los tanques con una pipeta de plástico. Un total de 15 larvas fueron medidas bajo un microscopio compuesto a lo largo de su eje antero-posterior (altura de la concha, Figura 2). Los datos obtenidos a lo largo del tiempo fueron ajustados mediante regresión lineal con el fin de calcular la tasa de crecimiento bruto por día.

La supervivencia se obtuvo después de concentrar las larvas de cada tanque en un volumen conocido. Con una pipeta automática se tomaron alícuotas de 1 mL por triplicado, estas se contaron bajo un microscopio compuesto con un contador manual y se extrapolaron al volumen de agua total.

La supervivencia acumulada se calculó según la ecuación descrita por Ferreira-Arrieta *et al.* (2015):

$$(N_t * 100) / N_0$$

dónde:

N_t= número total de larvas presentes al tiempo t

N₀= número de larvas presentes al inicio del experimento.

Al lote larval 1 se le dio seguimiento adicional posterior a la etapa de metamorfosis, se realizaron mediciones de altura de la concha (μ m) y se calculó el porcentaje de supervivencia tomando en cuenta el total de larvas de las tres réplicas (tanques) del lote.

2.3.2 Lote larval 4

La altura de la concha de las larvas se obtuvo de la misma forma descrita en la sección previa. Por otra parte, y debido a que se realizaron muestreos de larvas sin reemplazo para cuantificación de sustratos energéticos, se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de la supervivencia acumulada (SA):

$$SA = (S_t/100) * S_{t-1}$$

dónde:

S_t = supervivencia (%) al tiempo t = $(NL_t/NLp_{t-1}) * 100$

$t-1$ = evaluación anterior

NL_t = número de larvas presentes al tiempo t

NLp = número de larvas posteriores a muestreo al tiempo t

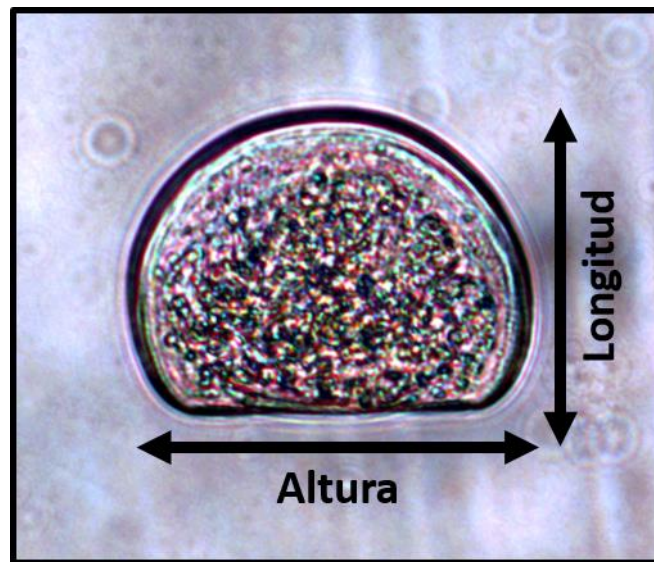


Figura 2.- Representación gráfica de la variable de altura de la concha (eje antero-posterior) evaluada durante el desarrollo larval de *Nodipecten subnodosus*.

2.4 Esquema de muestreo

Larvas de *N. subnodosus* fueron recolectadas de los tanques de cultivo cada vez que más del 70% de las larvas cambiaron de estadio según lo descrito por De la Roche *et al.* (2002) (Tabla 2). Las larvas de cada tanque se concentraron con tamices de luz de malla apropiada y posteriormente se tomaron por triplicado, volúmenes de 0.3 mL de larvas para cada uno de los análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos. Las muestras se colocaron en microtubos de 1.5 mL, previamente etiquetados. Posteriormente se enjuagaron con abundante agua destilada para eliminar las sales y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

Tabla 2.- Edad (días después de la fertilización, DDF) y estadio larval al momento de la toma de muestra para determinación de las reservas energéticas de larvas de *N. subnodosus*.

Edad (DDF)	Estadio larval
1	Charnela recta o larva "D"
5	Larva umbonada
11	Larva con mancha ocular
15	Larva pedivéliger

2.5. Determinación de peso seco, proteínas, lípidos y carbohidratos

2.5.1 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)

Se descongelaron las larvas, se colocaron en navcillas de aluminio pre-pesadas y se secaron en una estufa a 70 °C durante 24 h para eliminar la humedad. Se pesaron y después se incineraron en una mufla a 490 °C por 24 h para obtener el peso de cenizas (PC). El peso orgánico (PO) se obtuvo por diferencia entre el peso seco total y el peso de cenizas.

2.5.2 Análisis de proteínas

Para la extracción de proteínas, muestras de ≈ 30 mg de peso húmedo fueron colocadas en tubos de micro centrifuga de 2 mL con 0.1 g de cuentas de circonia/sílice. Se añadió 5 μ L de antioxidante BHT (Butilhidroxitolueno) y 1.5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y fueron agitadas durante 1 min a 4,800 rpm en un agitador Mini-Beadbeater-1™. Después de incubar en baño maría a 100 °C durante 15 min se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 min a 4,000 rpm en una centrífuga Thermo Scientific™ Heraeus Megafuge™ 16R. El sobrenadante fue transferido a un tubo de ensayo. Se realizó una segunda hidrólisis con NaOH repitiendo los pasos anteriores. La determinación colorimétrica de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry *et al.* (1951) usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro HACH® DR 6000™ a 750 nm.

2.5.3 Cuantificación de lípidos

La extracción de lípidos se realizó mediante la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959). Muestras de larvas de ≈ 7 mg de peso húmedo fueron colocadas en tubos de micro centrifuga de 2 mL con 0.1 g de perlas de circonia/sílice y se añadió 1.5 mL de la mezcla cloroformo:metanol (relación 1:2). Las muestras fueron homogeneizadas con un agitador Mini-Beadbeater-1™ durante 1.5 min a 4,800 rpm y se mantuvieron en oscuridad a 8 °C durante 20 h. Posteriormente se agitaron de nuevo y se centrifugaron a 4,000 rpm., durante 15 min a 10 °C. El sobrenadante fue colocado en un tubo de ensayo. Se realizó una segunda extracción con 1.5 mL de la mezcla cloroformo:metanol, repitiendo los pasos anteriores, posteriormente se mezclaron los sobrenadantes, después se añadió 2 mL de agua destilada, se agito mediante un mezclador de vórtice y se centrifugó a 4,500 rpm durante 15 min., se retiró la capa acuosa mediante una pipeta automática y se colocaron en una estufa Thermolyne™ Oven Series 9000® a una temperatura de 45 °C hasta que se evaporó por completo el cloroformo. Para la determinación colorimétrica de lípidos se utilizó el método de dicromato ácido descrito por Pande *et al.* (1963) y se leyó a una absorbancia de a 590 nm.

2.5.4 Cuantificación de carbohidratos

La extracción se realizó mediante la metodología descrita por Whyte (1987). Muestras de ≈ 5 mg de peso húmedo fueron colocadas en tubos de micro centrifuga de 2 mL con 0.1 g de perlas de zirconia/sílice y se añadió 1.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M. Las muestras fueron agitadas en un agitador Mini-Beadbeater-1™ durante 1 min a 4,800 rpm., después fueron llevadas a baño maría a 100 °C durante 1 h, posteriormente se enfriaron en baño maría a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4,000 rpm, a una temperatura de 10 °C, durante 15 min, enseguida se colocó el sobrenadante en un tubo de ensayo. La determinación de carbohidratos se realizó mediante el método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). La absorbancia se leyó a 485 nm.

2.6 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks, y se evaluó la homocedasticidad de los datos mediante la prueba de Levene.

A los resultados de crecimiento y supervivencia se les realizó un análisis de regresión lineal simple, y se consideró la ecuación de la recta como la tasa de crecimiento y de mortalidad de cada uno de los lotes larvales.

Los resultados de las tasas de crecimiento y de mortalidad fueron sometidos a un análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes.

Para los porcentajes de la cuantificación de sustratos energéticos (proteínas, carbohidratos y lípidos), se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar si existieron diferencias significativas entre los diferentes estadios larvales. Previo a este análisis se transformaron los datos mediante la función arco-seno.

En todos los casos se comprobó que se cumplieran con las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas. Las pruebas se llevaron a cabo con el paquete estadístico SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA) con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Desarrollo larval

EL porcentaje de eclosión de óvulos fertilizados de *N. subnodosus* fue de 78.4, 53.1 y 59.9% para los lotes larvales 1, 2 y 3 respectivamente. El porcentaje de eclosión del lote 4 no fue evaluado.

El estadio de larva "D" (24 horas post-fertilización, 90 μm altura de la concha) mostró la forma de charnela recta característico de este estadio además no se distinguió el sistema digestivo, evidenciado por la falta de pigmentación resultante de la ingesta de microalgas en la zona ventral (Fig. 2A). Durante los primeros 2-3 días de esta etapa, las larvas presentaron aparentemente poco movimiento natatorio y fue en aumento paulatinamente después de este intervalo de tiempo, por otra parte, el movimiento de órganos internos, del velo y de los cilios fue continuo.

El estadio de larva umbonada temprana (9 días post fertilización, 119 μm) muestra la perdida de la forma de media luna de la concha y el inicio de la deformación de la charnela recta para dar paso al umbo. También es evidente el completo desarrollo del sistema digestivo (Fig. 2B).

El estadio de umbonada tardía (11 días post fertilización, 200 μm) muestra una larva con un completo encubrimiento de la charnela recta debido a la aparición del umbo, y una forma ligeramente circular (Fig. 2C).

Por último el estadio de larva pedivéliger (13 días post fertilización, 211 μm) donde se observa el desarrollo del órgano pedal o "pie" y la aparición de la mancha ocular al borde de la glándula digestiva (Fig. 2D), factores que son distintivos de que la larva se encuentra en estado competente para llevar a cabo la metamorfosis.

Cabe resaltar que durante todo el desarrollo larval de los diferentes lotes no hubo presencia de protozoarios en la columna de agua.

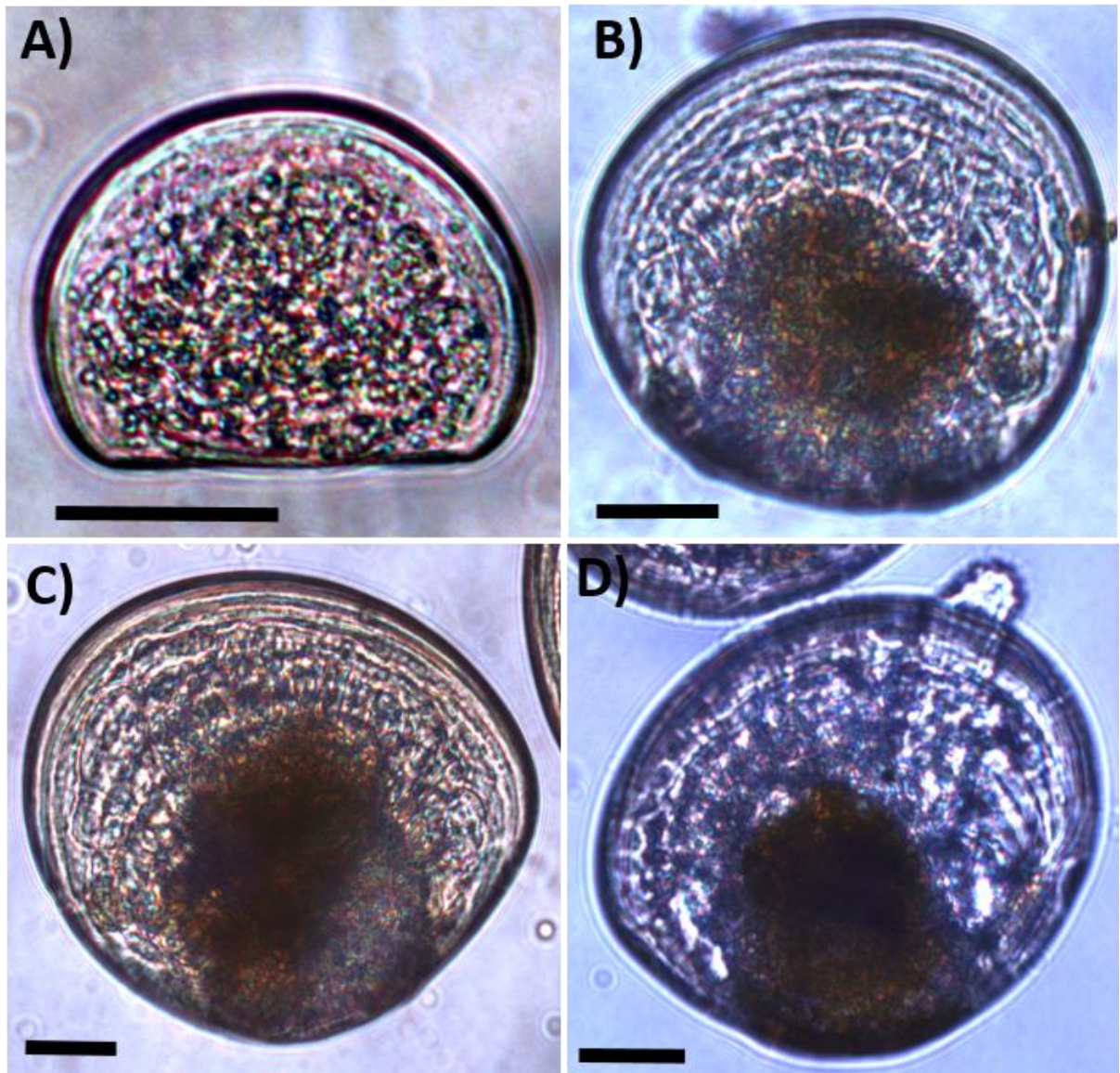


Figura 3.- Estadios característicos del desarrollo larval de *N. subnodosus*. A) Estadio larva "D"; B) Estadio larva umbonada temprana; C) Estadio larva umbonada tardía; Estadio larva pediveliger; Barra de escala = 40 μm .

3.2 Lote larval 1-3

3.2.1 Supervivencia y crecimiento larval

La supervivencia de *N. subnodosus* mostró una relación lineal inversa con la edad de las larvas (Fig. 3A), con una tasa de supervivencia de 9.91, 10.13 y 8.06 %/día para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 3) y una supervivencia final promedio al día 10 de cultivo (fase umbonada tardía) de $12.42 \pm 4.68\%$, $11.20 \pm$

7.21% y $22.22 \pm 9.98\%$ para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente. No existieron diferencias significativas entre las tasas de supervivencia de los tres lotes (ANCOVA, $P = 0.304$).

El crecimiento de los organismos en los tres desoves mantuvo una relación lineal directa con la edad de las larvas (Fig. 3B), con tasas de crecimiento de la concha de 5.51, 6.01 y 7.83 $\mu\text{m}/\text{día}$ para los desoves 1, 2 y 3 respectivamente (Fig. 2B, Tabla 4). La altura de la concha larval de *N. subnodosus* al final del experimento (día 10) fue de $139.17 \pm 6.05 \mu\text{m}$, $143.6 \pm 4.72 \mu\text{m}$ y $162.33 \pm 5.89 \mu\text{m}$ para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente, sin diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los tres lotes (ANCOVA, $P = 0.052$).

Durante el seguimiento que se le dio al lote larval 1 para inducción a la metamorfosis, se registró un 100% de larvas en estadio pedivéliger, con una altura promedio de la concha de $207 \pm 3 \mu\text{m}$ (día 14) y supervivencia de 5.08% (día 15) (Fig. 3A y 3B).

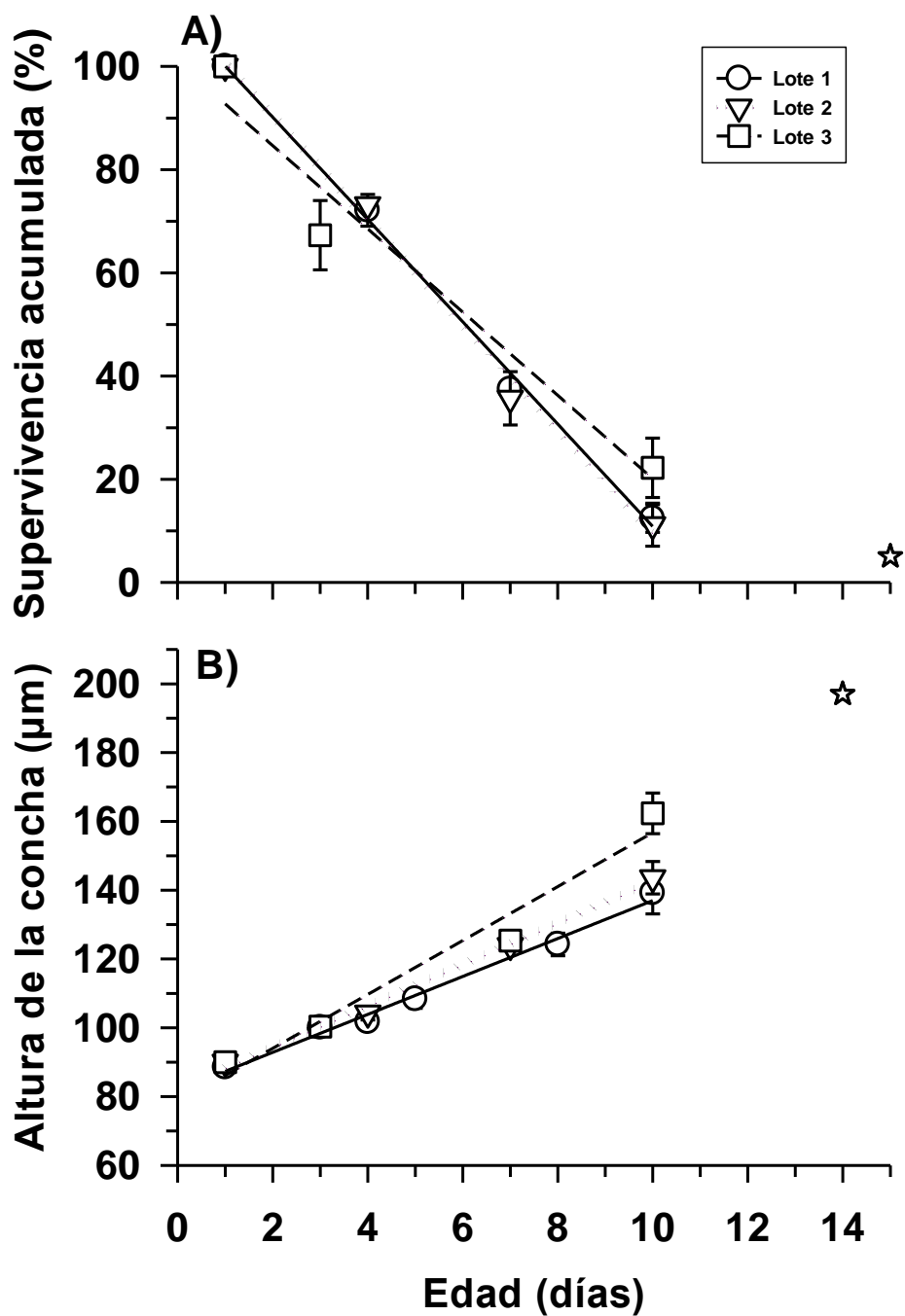


Figura 4.- Supervivencia acumulada y altura de la concha de larvas de *N. subnodosus* en 3 lotes larvales diferentes. A) Cambios temporales en la supervivencia acumulada (%) de *N. subnodosus*. B) Cambios temporales en la altura de la concha (μm) de larvas de *N. subnodosus*. ☆) Datos de seguimiento adicional de Lote 1. Las barras representan error estándar.

Tabla 3.- Ecuaciones de ajuste lineal de supervivencia larval por día de *N. subnodosus* vs edad en días (E) de tres lotes larvales diferentes. El coeficiente de determinación (R^2) y el valor de P del análisis de comparación de pendientes (ANCOVA) también se muestran.

Lote larval	Ecuación de ajuste	R^2	P
1	$S = 110.02 - 9.91 E$	0.996	
2	$S = 110.74 - 10.13 E$	0.993	0.304
3	$S = 100.81 - 8.06 E$	0.952	

Tabla 4.- Ecuaciones de ajuste lineal de altura de la concha de *N. subnodosus* vs edad en días (E) de tres lotes larvales diferentes. El coeficiente de determinación (R^2) y el valor de P del análisis de comparación de pendientes (ANCOVA) también se muestran.

Lote larval	Ecuación de ajuste	R^2	P
1	$L = 81.83 + 5.51 E$	0.989	
2	$L = 82.36 + 6.01 E$	0.994	0.052
3	$L = 78.34 + 7.83 E$	0.964	

3.3 Lote larval 4

3.3.1 Supervivencia y crecimiento larval

La tasa de supervivencia fue de 4.80 %/día, con un promedio de $33.67 \pm 0.3\%$ al final de los 15 días de cultivo (fase pedivéliger) (Fig. 4). En cuanto al crecimiento, las larvas pasaron de una longitud promedio de $87 \pm 5.2 \mu\text{m}$ en el día 1 (fase charnela recta) a una longitud final de $188.75 \pm 11.63 \mu\text{m}$ en 15 días de cultivo. La ecuación de ajuste lineal ($L = 75.24 + 7.29E$; $R^2 = 0.989$) dio como resultado una tasa de crecimiento de $7.29 \mu\text{m}/\text{día}$.

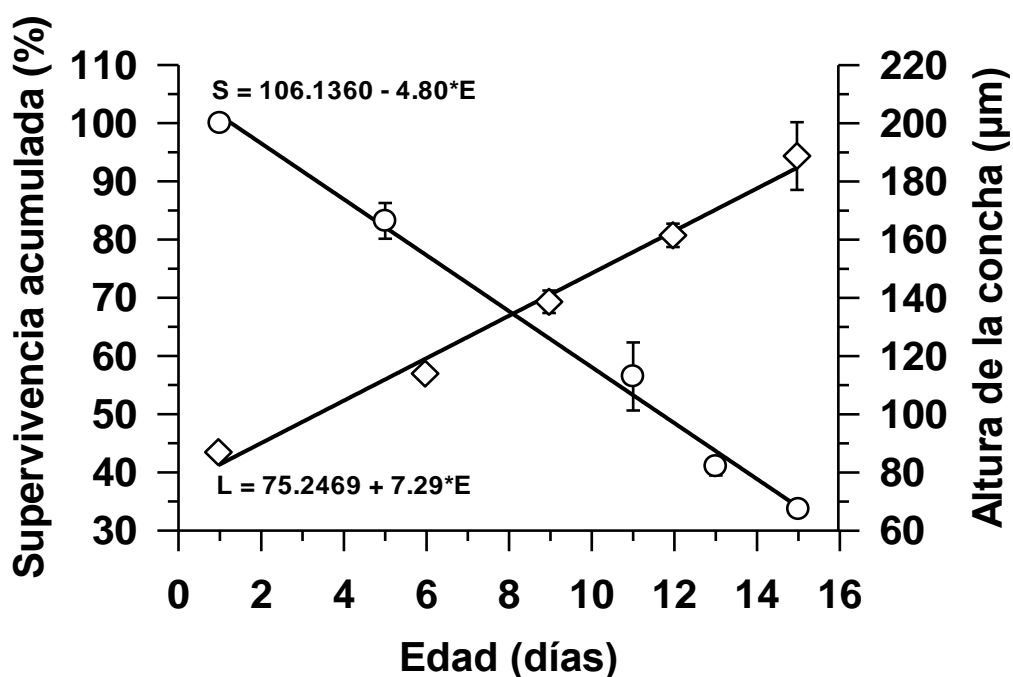


Figura 5.- Supervivencia acumulada (%) y altura promedio de la concha (μm) de lote larval 4. Las barras representan el error estándar. Las líneas y ecuaciones de ajuste de altura de la concha contra la edad y supervivencia acumulada contra la edad también se muestran.

3.3.2 Cambios temporales en la cantidad de sustratos energéticos

Las proteínas fueron el sustrato energético más abundante, y mantuvieron valores relativamente constantes a excepción del estadio de charnela recta (90 μm , 56.13 ± 0.64 %) (Fig. 6). En contraste, los lípidos mostraron una tendencia de acumulación conforme se acercaron a la etapa pedivéliger, donde los valores fueron estadísticamente mayores (90 μm , 26.5 ± 1.19 %; 190 μm , 38.63 ± 2.32 %), siendo este el sustrato con el mayor cambio proporcionalmente (Fig. 6). Por último, los carbohidratos fueron el sustrato energético menor durante todo el desarrollo, y aunque existen diferencias significativas entre el primer y tercer estadio, los valores son en general constantes (90 μm , 9.15 ± 0.2 %; 190 μm , 11.25 ± 0.5 %) (Fig. 6).

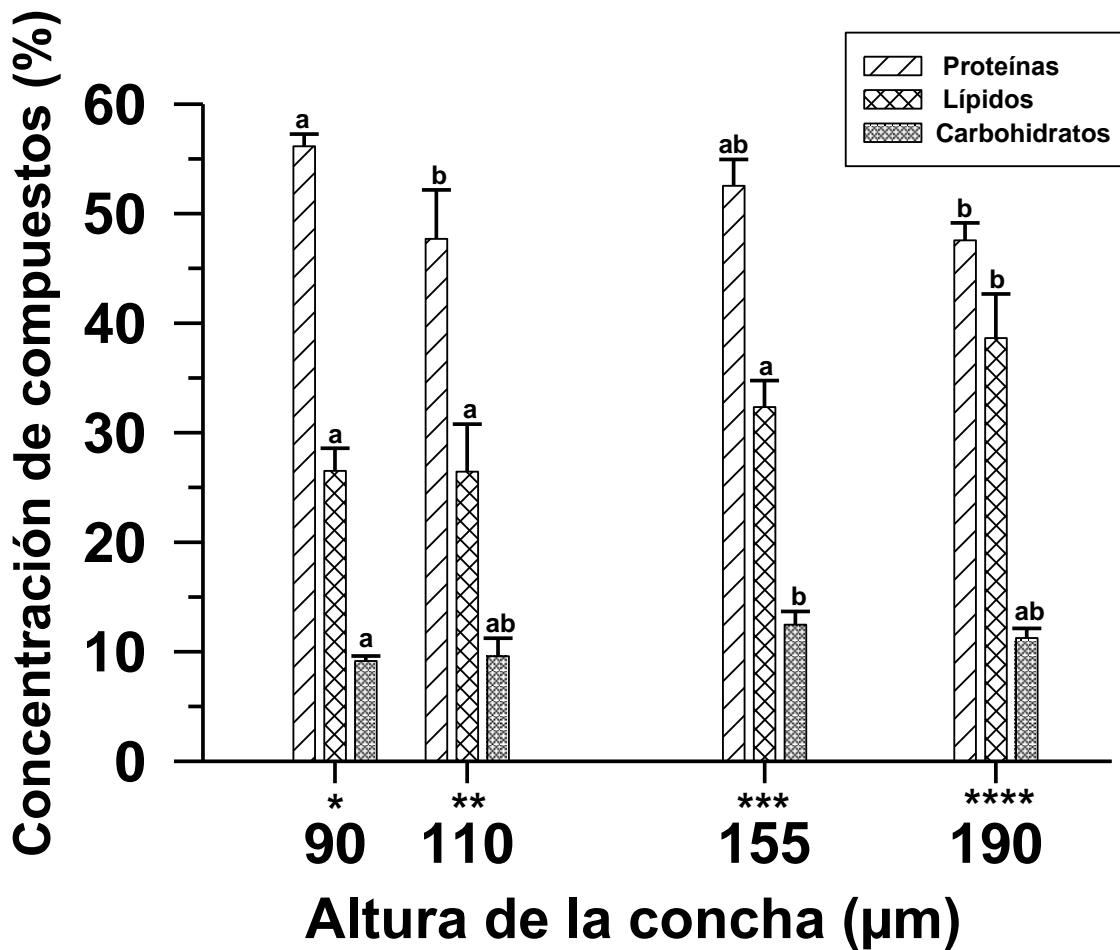


Figura 6.- Composición bruta de sustratos energéticos (con base en el peso orgánico) de larvas de *N. subnodosus* a lo largo del desarrollo larval. Las barras representan error estándar. Los índices indican las diferencias estadísticamente significativas entre el mismo sustrato energético. *Charnela recta; **Umbonada temprana; ***Umbonada tardía; ****Pedivéliger.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Desarrollo larval

En el cultivo de la almeja *N. subnodosus* se presentan diversas problemáticas que afectan su crecimiento y supervivencia a lo largo del desarrollo, entre las más importantes están la densidad de cultivo y los requerimientos nutricionales y energéticos de larvas y semillas, temas que requieren ser abordados durante el seguimiento de los cultivos. Como una primera instancia, es importante conocer los diferentes estadios de desarrollo de la especie y el tiempo de aparición de cada uno de ellos, para conocer si alguna variable ambiental o condición de cultivo está afectando su desarrollo, de tal manera que se puedan realizar los cambios pertinentes.

A la fecha existe poca información disponible sobre los diferentes estadios de desarrollo de *N. subnodosus*, en esta investigación se aporta un registro amplio de imágenes ilustrativas del desarrollo larval de *N. subnodosus*, que incluyen los estadios de larva de charnela recta o larva "D", larva umbonada temprana, larva umbonada tardía y larva pediveliger (Figura 2). Otros autores muestran imágenes solo de algunos estadios de desarrollo, como de charnela recta y larva umbonada, además de la etapa post-larval (García-Pámanes *et al.*, 2011, Mazón-Suastegui *et al.*, 2011).

La morfología de cada una de los estadios presentados por *N. subnodosus* en este estudio, son muy similares a lo que reportaron De la Roche *et al.* (2002) para la especie homóloga *Nodipecten nodosus* y Carreño-Hernández *et al.* (2012) para *Argopecten nucleus*, con un periodo larval de 10 a 12 días y una talla de metamorfosis de 195-210 μm ($25\pm 1^\circ\text{C}$).

En lo que respecta al movimiento natatorio de la etapa de charnela recta en los primeros 2-3 días, se observó que fue menor comparado con otras especies de moluscos bivalvos como *Panopea* sp. y *Crassostrea gigas* (observaciones personales). Aunque se desconoce si este comportamiento es provocado por algún factor del cultivo o es propio de la especie, este fue similar durante los cuatro lotes larvales evaluados en este trabajo, así como lotes anteriores producidos en el laboratorio.

Los porcentajes de eclosión registrados en este trabajo (53-78%) fueron mayores que los reportados para *N. nodosus* por De la Roche *et al.* (2002) quienes obtuvieron un 46.5% de eclosión con una relación óvulo:espermatozoide de 1:10, el doble que el de este experimento (1:5). Esto indica que una mayor

relación de óvulo:espermatozoide puede no asegurar una mayor fertilización y eclosión en el género *Nodipecten*, y es probable que la menor relación utilizada en este estudio haya disminuido el proceso de polispermia, favoreciendo una mayor eclosión.

4.2 Crecimiento y supervivencia

Este trabajo demostró que las larvas de *N. subnodosus* cultivadas bajo las condiciones iniciales establecidas tienen una tendencia de crecimiento lineal, así como una relación inversamente proporcional entre la supervivencia y la edad de las larvas, además de que no existieron diferencias significativas entre los lotes, lo que indica que los resultados son altamente predecibles y se podrían utilizar para hacer estimaciones de producción estadísticamente fundamentadas.

Durante el desarrollo de este estudio no se observaron signos de estrés ni presencia de protozoarios en ninguno de los lotes larvales, esto hace suponer que las larvas se mantuvieron saludables. También se encontró una tendencia lineal en las tasas de mortalidad durante todo el desarrollo que se repitió en los 4 lotes larvales. Esta tendencia de mortalidad fue similar a la reportada por Abasolo-Pacheco *et al.* (2009) para la misma especie aunque con una supervivencia mayor (80%) y una escala de cultivo de 60 L.

También, Carreño-Hernández *et al.* (2012) reportó en el pectínido *Argopecten nucleus* una tendencia de mortalidad similar, con un porcentaje de supervivencia de entre 30-48% a una escala de cultivo menor (15 L). Es probable que la tendencia de mortalidad encontrada sea natural, y que la supervivencia final de este estudio fue ligeramente mayor, en parte, a que no fue subestimada por el descarte larval utilizado en escalas de cultivo mayores, como la utilizada en esta investigación (500 L).

Este es el segundo estudio que utiliza una frecuencia relativamente alta de muestreo a lo largo del desarrollo larval de *N. subnodosus*. Con ello se pudo definir el momento adecuado para realizar los muestreos en el lote 4 (Tabla 2), requeridos para los análisis de sustratos energéticos durante los estadios más representativos del desarrollo larval. Villegas-Carrasco (2004) reportó frecuencias de muestreo diarias o cada tres días para evaluar la duración del período larval y la tasa de crecimiento.

La consistencia en el desempeño de los lotes larvales 1-4 donde las tasas de crecimiento solo tuvieron una variación aproximada de 2 $\mu\text{m}/\text{día}$ y 11% de supervivencia, contrastan con la alta variabilidad de los

resultados indicados en Villegas-Carrasco (2004) para *N. subnodosus*, ya que reportó que las tasas de crecimiento variaron hasta 6 $\mu\text{m}/\text{día}$ entre lotes, así como hasta un 66% de diferencia en la supervivencia final. También, Abasolo-Pacheco *et al.* (2009) reportaron amplios márgenes en tasas de crecimiento (1.4-6 $\mu\text{m}/\text{día}$) y porcentajes de supervivencia final (0-80%) utilizando diversos tratamientos en el agua de cultivo. Es posible que la inconsistencia en la replicabilidad de las variables de crecimiento y supervivencia de diferentes lotes larvales, así como el probar diversas fuentes de agua en el cultivo de *N. subnodosus* son reflejo de que no ha sido posible adoptar una metodología estándar para el cultivo de esta especie.

Es importante mencionar que las mediciones de alimento remanente pudieron ser sobreestimadas y en consecuencia asumir que la concentración inicial cubría la demanda de alimento de las larvas. Esto debido a que el límite de detección celular del contador de partículas utilizado es de aproximadamente 10 $\text{cél}/\mu\text{L}$ y esto no fue considerado al momento de medir la concentración celular, las cuales se mantuvieron entre 9 y 11 $\text{cél}/\mu\text{L}$.

Posiblemente las variables de supervivencia y crecimiento puedan ser mejoradas al utilizar una mayor ración de alimento. Villegas-Carrasco (2004) utilizó una mayor ración de alimento (20-40 $\text{cél}/\mu\text{L}$) en sus 12 lotes larvales, y obtuvo tasas de crecimiento y porcentajes de supervivencia comparables y mayores al de este estudio. Cabe destacar que se observó un posible efecto de la densidad larval sobre estas dos variables. Por otro lado, Abasolo-Pacheco *et al.* (2009) reportaron una supervivencia del 80% con una ración de 20-30 $\text{cél}/\mu\text{L}$, aunque sus tasas de crecimiento fueron comparables a las de este estudio, posiblemente por el efecto de la densidad antes mencionado. Por lo anterior, en el presente estudio no se descarta la posibilidad de que tanto las tasas de crecimiento como la supervivencia puedan incrementarse si se utilizan raciones más altas.

Esta es la primera ocasión que se reporta el uso de la mezcla de *Isochrysis* sp. (clon T-ISO) y *P. pinguis* en la alimentación de *N. subnodosus* y los resultados de la cuantificación de sustratos energéticos (Tabla 6) indican que las larvas no tuvieron una deficiencia en el contenido de lípidos durante el desarrollo larval con esta mezcla. Además, las larvas pre-metamórficas tuvieron una supervivencia relativamente alta una vez que se metamorfosean (datos no publicados), lo cual indica que la calidad nutricional de las larvas fue buena. Pernet *et al.*, (2003) reportaron deficiencias en el contenido de lípidos en *P. magellanicus* utilizando la dieta de *I. galbana*-*P. lutheri* (1:1) con la misma ración de alimento que este trabajo. Esto hace suponer que la incorporación de *P. pinguis* a la dieta y una ración de alimento mayor pudiera resultar en el incremento de la supervivencia.

Tabla 5.- Comparación de tasas de crecimiento, supervivencia y diferentes condiciones de cultivo de larvas del género *Nodipecten* de diversos estudios. LI=Lote larval; AI=Altura inicial; R=Replicas; T=Temperatura de cultivo; DI=Densidad inicial; TM=Talla de metamorfosis; S=Supervivencia; SD=Sin Datos; AF=Agua de mar filtrada; AP=Agua de mar pasteurizada; ADP=Agua de mar tomada de un pozo de playa; AS=Agua de mar sintética; APC=Agua de mar con probiótico comercial. CCAL=*Chaetoceros calcitrans*; CG=*Chaetoceros gracilis*; CM=*Chaetoceros muelleri*; ML=*Monochrysis lutheri*; PP=*Pavlova pinguis*; PS=*Pavlova salina*; TISO=*Isochrysis galbana*.

Especie	Estadio inicial	LI /AI (µm)	R	Periodo larval (días)	Vol. cultivo (L)	T (°C)	DI (org/mL)	Microalga	Ración de alimento (cél/µL)	TM (µm)	Tasa de crecimiento (µm/día)	S (%)	Referencia	
<i>N. subnodosus</i>	Larva D	1	89	3	15						5.5	12	Este estudio	
		2	90	3	15	500	27 ± 1	5	TISO	15	200-	6		11
		3	90	3	14				PP		210	7.8		22
		4	87	3	15				(1:1)			7.3		34
	4	SD	2	14					26		11	TISO-CCAL	30-40	196
	9	85	2	11		25	24	TISO-CCAL	20-40	SD	7.4	30		
	10	82	2	13	5,000	25	50	TISO-CCAL	20-40	205	9.8	6		
	11	86	3	12		23	24	TISO-CCAL-ML	25-37	SD	7.3	25		
	12	89	2	15		25	27	TISO-CCAL-ML	35	209	8.9	15		
	Larva D	AF		3	15							6	80	Abasolo-Pacheco et al. 2009
		AP		3	15		26 ± 1	5-6	TISO			5	55	
		ADP	60	3	SD	60			PS	20 - 30	S.D	3.8	40	
AS			3	SD		*CM					1.4	0		
APC			3	SD							1.6	0		
<i>N. nodosus</i>	Larva D	1	95	4	12	450	27 ± 1	10	TISO CG	30-70	208 ± 1	10.8	SD	De la Roche et al. 2002

*Agregado a partir del estadio de larva umbonada hasta asentamiento. **Solo se incluyen datos de lotes con 2 o más replicas.

4.3 Sustratos energéticos

La relevancia del estudio de las reservas energéticas (proteínas, lípidos y carbohidratos), permite conocer cuales sustratos serán metabolizados para cubrir la demanda energética de los procesos como la embriogénesis y la metamorfosis (Da Costa *et al.*, 2011), lo que depende en gran medida del almacenamiento y utilización de cada uno de ellos y como finalmente éstos influyen en el crecimiento y supervivencia larval.

La principal fuente de energía en larvas de moluscos bivalvos son los lípidos, principalmente en forma de lípidos neutros o triacilglicerol, y se dice que su calidad depende en gran parte de la composición de ácidos grasos de cadena larga (Marshall *et al.*, 2010). Por otra parte, las proteínas realizan una función principalmente estructural y están relacionadas directamente con el crecimiento larvario en *A. purpuratus* (Farías-Molina, 2001). Por último los carbohidratos, que contribuyen con solo una pequeña fuente de energía, se sugiere que pueden ser importantes en el balance de nutrientes para síntesis de tejido, debido a que probablemente inducen a un ahorro en el uso de la proteína y ciertos ácidos grasos (Whyte *et al.*, 1989).

Este es uno de los pocos estudios donde se cuantificó el contenido de sustratos energéticos a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo larval de un molusco bivalvo, y el segundo en *N. subnodosus*. Con los datos recabados en este estudio se logró observar que los valores de acumulación son similares a los reportados para otros pectinidos como *P. yessoensis*, *Crassadoma gigantea* y *Argopecten purpuratus* (Tabla 6).

Cabe destacar que los valores aquí encontrados difieren en gran medida con lo reportado por Abasolo-Pacheco *et al.* (2009) para la misma especie y para *Argopecten ventricosus*, donde el contenido de lípidos fue similar o incluso menor que el de carbohidratos al inicio y al final del desarrollo larval. Además, tanto los lípidos como los carbohidratos son hasta un orden de magnitud menores a los encontrados en este estudio (Tabla 6). La principal diferencia radicó en el uso de diferentes dietas, aunque se desconoce si esto pudo generar las discrepancias entre ambos estudios.

Las proteínas fueron el sustrato mayoritario durante todo el desarrollo larval, similar al de otros pectinidos (Tabla 6) e incluso al de larvas de otros moluscos bivalvos como *Solen marginatus*, *Ostrea edulis* y *Crassostrea gigas*, entre otros (Holland y Spencer, 1973. His y Maurer, 1988. Da Costa *et al.*, 2011). El contenido relativo de proteínas disminuyó en la última etapa del desarrollo (Figura 5), lo que pudo ser

resultado de la demanda de proteínas estructurales requeridas para el crecimiento y desarrollo, principalmente como el órgano pedal o “pie” y filamentos branquiales primarios, similar a lo reportado para la especie *Placopecten magellanicus* (Pernet *et al.*, 2003).

El contenido de lípidos exhibió un patrón de acumulación hacia el final del experimento. Esto sugiere que los lípidos fueron acumulados en preparación a la demanda energética que ocurre durante la metamorfosis. Algo similar sucede en postlarvas de *Ostrea edulis*, donde Holland y Hannant (1974) demostraron mediante experimentos de inanición que los lípidos son la principal fuente de energía endógena en esta especie, y por lo mismo, son acumulados hasta alcanzar valores máximos previos a la metamorfosis. Además de esto, las larvas de *N. subnodosus* acumularon un porcentaje relativo de lípidos mayor al reportado para otros pectínidos (hasta 38% de peso orgánico) (Tabla 6).

Aunque se desconoce el porqué de este comportamiento, se sugiere que la dieta suministrada permitió cubrir la demanda energética requerida durante todo el desarrollo larval, y que en el caso de *N. subnodosus*, el proceso de metamorfosis requiere de un porcentaje alto de lípidos.

La inclusión de la microalga *P. pinguis* en este estudio, que ha sido reportada con alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (EPA, 22:5 n-3; DHA, 22:6 n-3; DPA, 22:5 n-6, Milke *et al.*, 2008) en combinación con *I. galbana* pudo ser uno de los factores principales de la alta acumulación de lípidos por parte de *N. subnodosus*, así como la diferencia entre la cantidad de lipidos obtenidos por Abasolo-Pacheco *et al.*, (2009).

Por otra parte, Milke *et al.* (2008) reportaron un excelente crecimiento de postlarvas de *Placopecten magellanicus* con el uso combinado de *P. pinguis*, *P. 439* y *Chaetoceros muelleri* como alimento. Las dietas mixtas funcionaron mejor que las monodietas, y las postlarvas mostraron un desempeño muy pobre cuando se alimentaron solamente con *C. muelleri*. Estos autores, basándose en el excelente crecimiento postlarval obtenido con la inclusión de *P. pinguis* y/o *P. 459* en las dietas, y el alto contenido del ácido graso docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-6) presente en ellas, sugirieron que estas microalgas cumplen un papel nutricional importante para los pectínidos.

No obstante, el diseño de este experimento no estuvo enfocado en conocer el papel en específico de *P. pinguis* en el contenido bioquímico de las larvas de *N. subnodosus* por lo que se recomienda realizar estudios de la dinámica y composición de lípidos, para poder conocer el aporte de esta microalga a las larvas de esta especie.

Las larvas de *N. subnodosus* al parecer no utilizaron los carbohidratos como fuente de energía ya que sus niveles se mantuvieron por debajo de los lípidos, tal como ha sido reportado en otros pectínidos (Tabla 6). Sin embargo, no se descartan otras funciones críticas de este tipo de sustrato tales como ser utilizados como fuente energética, y evitar el uso de proteína como energía (Haws *et al.*, 1993), ya que esto propiciaría un detrimento del desarrollo larval de bivalvos en general.

Es probable que la cantidad suministrada de alimento haya sido el factor que más influyó en las tasas de crecimiento obtenidas durante el presente estudio, lo anterior debido a que la ración usada a lo largo de todo el desarrollo larval fue de 15 cél/ μ l, mientras que las raciones diarias usadas para la misma especie por otros autores, como Villegas-Carrasco (2004) y Abasolo-Pacheco *et al.* (2009) oscilaron entre 15-40 cél/ μ L. El control y el incremento en la concentración de alimento podría mejorar el crecimiento, y con esto acortar el periodo del desarrollo larvario.

Esta hipótesis es reforzada con lo reportado por Villegas-Carrasco (2004), donde encontró que existe una correlación positiva entre la disponibilidad celular diaria por individuo y la tasa de crecimiento en los 12 lotes larvales evaluados. A pesar de esto, las tasas de crecimiento obtenidas en este estudio son cercanas o superiores a las obtenidas por estos autores, es por ello que no se descarta que, como se comentó anteriormente, la inclusión de la microalga *P. pinguis* en la dieta repercutió de manera favorable en el desempeño larval de *N. subnodosus*.

Esta investigación y los resultados obtenidos permiten conocer cuál es el desempeño y el contenido de sustratos energéticos de las larvas de *Nodipecten subnodosus*, bajo las condiciones de cultivo establecidas. Con ello es posible mejorar la producción, así como saber hacia dónde dirigir posibles estudios posteriores sobre esta especie, y de esta manera disminuir las limitantes que se tienen para poder impulsar proyectos a escala piloto-comercial y comercial. En este sentido, es importante mencionar que la producción larval final de este estudio fue utilizada como insumo biológico en una planta piloto-comercial dedicada al cultivo de esta especie. Además, estas investigaciones pueden ser útiles para otras empresas interesadas en la producción acuícola de esta especie.

Tabla 6.- Contenido porcentual de sustratos energéticos (%) de larvas de charnela recta ("D") y pedivéliger de distintas especies de pectínidos. Los porcentajes están expresados en función del peso orgánico (PO) o peso seco (PS) de los organismos.

Especie	Estadio	Contenido bioquímico (%)						Referencia
		Proteínas		Lípidos		Carbohidratos		
		PO	PS	PO	PS	PO	PS	
	Larva "D"	56.1	17.7	26.5	8.3	9.1	2.9	Presente estudio
	Pedivéliger	47.5	12.2	38.6	9.9	11.2	2.2	
<i>Nodipecten subnodosus</i>	Larva "D"	SD	2.1	SD	1	SD	1.7	Abasolo-Pacheco <i>et al.</i> 2009
	Pedivéliger	SD	7	SD	0.9	SD	1.9	
<i>Argopecten ventricosus</i>	Larva "D"	SD	3.7	SD	1.7	SD	2.4	Abasolo-Pacheco <i>et al.</i> 2009
	Pedivéliger	SD	12.2	SD	1.8	SD	1.6	
<i>Argopecten purpuratus</i>	Larva "D"	43.9	SD	19.8	SD	5.5	SD	Farías <i>et al.</i> 1998
	Pedivéliger	55.9	SD	7.4	SD	8.5	SD	
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Larva "D"	SD	29.6	SD	11.2	SD	4.2	Whyte <i>et al.</i> 1989
<i>Crassadoma gigantea</i>	Larva "D"	45.5	24.6	22.2	12	3	1.6	Whyte <i>et al.</i> 1990
	Pedivéliger	45.4	16.8	20.9	7.72	5.7	2.1	Whyte <i>et al.</i> 1992

Capítulo 5. Conclusiones

1. Las larvas de *N. subnodosus* de cuatro lotes distintos cultivadas en tanques cilíndrico-cónicos de 500 L mostraron tasas de crecimiento y supervivencia de tipo lineal y estadísticamente similares, lo que sugiere una metodología estandarizada y consistente.
2. La supervivencia final de larvas de *N. subnodosus* varió entre 11 a 33%. Las tasas de crecimiento entre 5.5 a 7.8 $\mu\text{m}/\text{día}$.
3. Las proteínas (56-47% del peso orgánico) fueron el sustrato energético más abundante y se mantuvieron relativamente estables durante el desarrollo larval de *N. subnodosus*.
4. Los lípidos (26-38% del peso orgánico) aumentaron al acercarse a la etapa pediveliger, lo cual sugiere que este sustrato energético es acumulado para sustentar el gasto energético requerido en la metamorfosis.
5. Los lípidos fueron más abundantes en *N. subnodosus* que en otros pectínidos.
6. Los carbohidratos (9-11% del peso orgánico) no fueron utilizados como fuente de energía por las larvas de *N. subnodosus*.

Literatura citada

- Abasolo-Pacheco, F., Mazón-Suástegui, J.M y Saucedo, P.E. 2009. Response and condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture*. 296: 255-262.
- ANUIES. Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior. 2017. Dona UABC semillas de almeja producida en sus laboratorios. Consultado el 28 de abril de 2018 de http://www.anui.es/noticias_ies/dona-uabc-semillas-de-almeja-producida-en-sus-laboratorios
- Arellano-Martínez, M.A., Ceballos-Vázquez, B.P., Ruíz-Verdugo, C., Pérez de León, E., Cervantes-Duarte, R. y Domínguez-Valdéz, P.M. 2011. Growth and reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culture system at Guerrero Negro lagoon, Baja California Sur, México. *Aquaculture Research*. 42: 571-582.
- Bligh, E.G y Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8): 911-917.
- Carreño-Hernandez, Y.K., Acosta-Ortiz, 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*. 41(1): 103-120.
- Cerón-Ortiz, A.N. 2006. Efecto interactivo de la temperatura y la calidad nutrimental de microalgas sobre algunas variables fisiológicas en semillas de mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Cerón-Ortiz, A.N., Cordero, B., Arredondo-Vega, B.O. y Voltolina, D. 2009. Effect of algal diet and temperature on survival, growth and biochemical composition of spat of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture*, 298: 64-69.
- Chu, F.L.E. y Greaves, J. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*. 110: 229-236.
- CONACyT. 2017. Acuicultura y genómica al rescate de la almeja mano de león en Baja California. Consultado el 28 de marzo de 2018, <http://www.conacytprensa.mx/index.php/tecnologia/biotecnologia/14052-acuicultura-y-genomica-al-rescate-de-la-almeja-mano-de-leon-en-baja-california>
- CONAPESCA, 2013. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca 2013 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Mazatlán, Sinaloa México. 299 pp. Recuperado en enero de 2018 de: <https://es.scribd.com/document/270323388/Anuario-Estadistico-de-Acuicultura-y-Pesca-2013>

- Da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J. y Martínez-Patiño, D. 2011. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Marine Biology*. 158: 1829-1840.
- De la Roche, J.P., Marín, B., Freitas, L. y Vélez, A. 2002. Embryonic development and larval and post-larval growth of the tropical scallop *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *nodosus* (L. 1758) (Mollusca: Pectinidae) *Aquaculture Research*. 33: 818-827.
- Diarte-Plata, G. 2007. Cultivo experimental de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) en la costa Norte de Sinaloa, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Sinaloa. México. 100 pp.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemistry*. 28(3): 350-356.
- Duerr, E.O., Molnar, A. y Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*. 7: 65-70.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Roma. 224 pp.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma. 233 pp.
- Farías, A., Uriarte, I. y Castilla, J.C. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*. 166: 37-47.
- Farías-Molina, A. 2001. Nutrición en moluscos pectínidos. En: Maeda-Martínez, A.N. (Ed.). 2001. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencias y Acuicultura. Editorial LIMUSA. México 501 p.
- Félix-Pico, E.F., Quezada, A.T. y Cabanillas, J.S. 1989. Antecedentes en el cultivo de *Argopecten circularis* (Sowerby), en Baja California Sur, México. *Inv. Mar. CICIMAR* 4:1
- Félix-Pico, E.F., Villalejo-Fuerte, M., Tripp Quezada, A. y Holguín-Quiñones, O. 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture at the national marine park of Bahía de Loreto, B.C.S., Mexico. *En: Book of Abstracts. 12th International Pectinid Workshop*, 5-11 May. Bergen, Norway. pp. 39- 40.
- Ferreira-Arrieta, A., García-Esquivel, Z., González-Gómez, M.A. y Valenzuela-Espinoza, E. 2015. Growth, survival, and feeding rates for the geoduck *Panopea globosa* during larval development. *Journal of Shellfish Research*. 34(1): 55-61.
- Gallager, S.M., Mann, R. y Sasaki, G.C. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*. 56: 81-103.

- García-Domínguez, F., Castro-Moroyoqui, P. y Félix-Pico, F. 1992. Spat settlement and early growth of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in Laguna Ojo de Liebre. B.C.S., México, 1989-1990. *Journal of Shellfish Research*. 11: 195.
- García-Esquivel, Z., Bricelj, V.M. y González-Gómez, M.A. 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 263: 77-103.
- García-Pámanes, F., Carpizo-Ituarte, E., Cerón-Ortíz, A.N., Chi-Barragan, G., Cordero-Esquivel, B., Cota-Ceseña, F., De la Roche, J.P., García-Pámanes, L.E., García-Pámanes, J., López-Sánchez, J.A., Maeda-Martínez, A.N., Mazón-Suástegui, J.M., Palma-Aviña, O., Robles-Mungaray, M., Rupp, G.S y Voltolina, D. 2011. Alimentación de *Nodipecten* spp. En: Maeda-Martínez, A.N., Lodeiros-Seijo, C. (Eds.). *Biología y Cultivo de los Pectínidos del Género Nodipecten*. Editorial LIMUSA, México.
- Haws, M.C., DiMichele, L. y Hand, S.C. 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 2:207-217.
- Helm, M.M, Bourne, N. y Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO, Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 184 pp.
- His, E. y Maurer, D. 1988. Shell growth and gross biochemical composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture*. 69: 185-194.
- Holland, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, 4:85-123.
- Holland, D.L. y Hannant, P.J. 1974. Biochemical changes during growth of the spat of the oyster, *Ostrea edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 54(4): 1007-1016.
- Holland, D.L. y Spencer, B.E. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 53: 287-298.
- INAPESCA. (Instituto Nacional de Pesca). 2012. Carta Nacional Pesquera. 236 pp.
- Keen, M. 1971. *Sea Shells of Tropical West America: marine mollusks from Baja California to Peru*. Segunda edición. Standford University Press. Standford, California. EE.UU. pp. 1064.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J. y Pérez-Camacho, A. 1999. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Experimental Marine, Biology and Ecology*. 238: 225-242.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-275.

- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: Lovatelli, F.A., Uriarte, I. (Eds.), Actas de Pesca de la FAO. No.12. FAO, Roma, pp. 91–100.
- Marshall, R., McKinley, S y Pearce, C.M. 2010. Effects of nutrition on growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*. 2(1): 33-55.
- Massó-Rojas, J.A., Morales-Bojórquez, E., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B.P., Talavera-Maya, J. y Ceseña-Espinoza, N. 2014. Almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. En: Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) (Ed.). Sustentabilidad y pesca responsable en México evaluación y manejo. pp. 17-48.
- Mazón-Suástegui, J.M., Maeda-Martínez, A.N., Robles-Mungaray, M., De la Roche, J.P., Rupp, G.S., Mendes-De-Bem, M., Velasco, L.A y Freites-Valbuena, L.F. 2011. Avances en la producción de juveniles de *Nodipecten* spp. En: Maeda-Martínez, A.N., Lodeiros-Seijo, C. (Eds.). Biología y Cultivo de los Pectínidos del Género *Nodipecten*. Editorial LIMUSA, México.
- Milke, L.M., Bricelj, V.M. y Parrish, C.C. 2008. Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. in unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*. 276(1-4):130-142.
- Millán, M.M. 1997. Experimentos de inducción a la maduración gonádica de *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842) y estudio del valor nutricional de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, durante su crianza larvaria. Tesis de maestría en Ciencias en Acuicultura. UABCS. La Paz, México.
- Narvarte, M.A., Félix-Pico, E. y Ysla-Chee, L.A. 2001. Asentamiento larvario de pectínidos en colectores artificiales. pp. 173-192. En: A.N. Maeda-Martínez (ed.). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial LIMUSA, México.
- Osuna-García, M. 2006. Efecto de la densidad en el cultivo de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby II, 1835), en la Península de Baja California, México. Tesis de Maestría, CICIMAR, La Paz, México. 82p.
- Pande, S.V., Khan, R.P y Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*. 6(5): 541-423.
- Pernet, F., Tremblay, R y Bourget, E. 2003. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid composition. Part II: Larval growth, competency and settlement. *Journal of Shellfish Research*. 22(2): 377-388.
- Ponce-Díaz, G., Massó-Rojas, A., Félix-Pico, E.F., Morales-Zárate, M.V., García, N., Lodeiros-Seijo, C y Lluch-Cota, S.E. 2011. *Nodipecten* spp. Como recurso pesquero. En: Maeda-Martínez, A.N., Lodeiros-Seijo, C. (Eds.). Biología y cultivo de los pectínidos del género *Nodipecten*. Editorial LIMUSA, México.

- Ramírez-Castillo, E.R. 2003. Desarrollo reproductivo estacional de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 21. Ciudad Obregón, Sonora. 49 p.
- Reinecke, R.M.A. 1981. Madurez y desove de *Lyropecten subnodosus*, Sowerby, 1835 (Bivalvia; Pectinidae) en Bahía Ojo de Liebre, B.C. Sur, México. Informe Técnico Interno, CRIP La Paz, B.C. Sur, México, 10 p.
- Sühnel, S y Lagreze-Squella, F.J. 2016. Chapter 8. Nutrition in Pectinids. *En*: Shumway, E y Jay-Parsons, D (ed). Scallops. Biology, Ecology, Aquaculture and Fisheries. Third edition. Elsevier.
- Villegas-Carrasco, M.J. 2004. Evaluación de los cultivos larvarios de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), realizados en el laboratorio de larvicultura de especies marinas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, de 1998 a 2003. Tesis de ingeniería. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. 106 p.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241.
- Whyte, J.N.C., Bourne, N. y Hodgson, C.A. 1987. Assesment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Experimental Marine, Biology and Ecology*. 113: 113-124.
- Whyte, J.N.C., Bourne, N. y Hodgson, C.A. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*. 78: 333-347.
- Whyte, J.N.C., Bourne, N. y Ginter, N.G. 1990. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Biology*. 106: 239-244.
- Whyte, J.N.C., Bourne, N., Ginther, N.G. y Hodgson, C.A. 1992. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantean* (Gray). *Journal of Experimental Marine, Biology and Ecology*. 163: 13-29.