

JACUMAR

JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

INFORME FINAL

**Título: Optimización del cultivo intensivo de la almeja e
identificación de marcadores genéticos para el
seguimiento de las repoblaciones**

Índice

RESUMEN EJECUTIVO	4
1.- DATOS ADMINISTRATIVOS	4
2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL	5
2.1. OBJETIVOS	5
SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA EN CRIADERO.....	5
SUBPROYECTO 2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LAS REPOBLACIONES.....	5
2.2. METODOLOGÍA.....	6
SUBPROYECTO 1:	6
SUBPROYECTO 2:	6
2.3. RESULTADOS	8
SUBPROYECTO 1:	8
SUBPROYECTO 2:	13
2.4. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN	17
SUBPROYECTO 1:	17
SUBPROYECTO 2:	19
2.5. VALORACIÓN	20
2.6. DIFUSIÓN.....	21
2.7. INCIDENCIAS DE DESARROLLO	21
INFORME FINAL EXTENSO.....	28
1.- DATOS ADMINISTRATIVOS.....	28
2.- RESULTADOS TÉCNICOS DEL PLAN NACIONAL	41
2.1. OBJETIVOS INICIALES	41
2.1.1. SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA FINA EN CRIADERO	42
2.1.2. SUBPROYECTO 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BANCOS NATURALES Y DE LOS STOCKS DE CULTIVO DE LA ALMEJA.....	44
2.2. OBJETIVOS REALIZADOS	45
2.3. METODOLOGÍA.....	46
2.3.1. SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA FINA EN CRIADERO	46
2.3.1.1. Línea 1. Determinación de los criterios de calidad de las puestas. 46	
2.3.1.2. Línea 2. Pruebas de alimentación en los cultivos larvarios..... 53	
2.3.1.3. Línea 3. Identificación de la microbiota asociada a mortalidades presentes en las diferentes fases del cultivo en criadero	68
2.3.2. SUBPROYECTO 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BANCOS NATURALES Y DE LOS STOCKS DE CULTIVO DE LA ALMEJA.....	75
2.4. RESULTADOS	83

2.4.1. SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA FINA EN CRIADERO	83
2.4.1.1. Línea 1. Determinación de los criterios de calidad de las puestas.	83
2.4.1.2. Línea 2. Cultivos larvarios y realización de pruebas de alimentación larvaria.....	100
2.4.1.3. Línea 3. Identificación de la microbiota asociada a mortalidades presentes en las diferentes fases del cultivo en criadero	131
2.4.1.4. Línea 4. Preengorde de semilla.....	148
2.4.2. SUBPROYECTO 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BANCOS NATURALES Y DE LOS STOCKS DE CULTIVO DE LA ALMEJA.....	151
2.5. CONCLUSIONES	191
2.6. BIBLIOGRAFÍA	194
3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO.....	198

RESUMEN EJECUTIVO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TÍTULO: Optimización del cultivo intensivo de la almeja e identificación de marcadores genéticos para el seguimiento de las repoblaciones

FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio: 2008

Finalización: 2011 (Prórroga sin financiación)

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: Dorotea Martínez Patiño

Organismo/ Centro: Consellería do Medio Rural e do Mar

Departamento: CIMA-Ribadeo

Teléfono: 982-889404

Fax: 982-889419

Correo electrónico: mptea@cimacoron.org

Dirección postal completa: Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo. Lugo

COMUNIDADES AUTÓNOMAS PARTICIPANTES

CA de Galicia

- CIMA (Centro de Investigacións Mariñas). Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia.
- XENOMAR. Departamento de Bioloxía celular e Molecular. Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña.
- Colaboración, Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía. Facultade de Bioloxía. Universidade de Santiago de Compostela.

CA de Andalucía

- Centro Agua del Pino. IFAPA (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agrario, Pesquero, Alimentario y de la Producción Ecológica). Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.

CA de Asturias

- Centro de Experimentación Pesquera. Dirección General de Pesca Marítima. Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos. Principado de Asturias.
- Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Oviedo.

CA de Cantabria

- Servicio de Actividades Pesqueras y Servicio de Laboratorio y Control. Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca. Gobierno de Cantabria.
- Tinamenor S.A. Grupo Tinamenor. Empresa privada.

CA de Cataluña

- IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) de Sant Carles de la Ràpita. Centre d'Aquicultura. Generalitat de Catalunya.
- Instituto de Acuicultura Torre de la Sal. CSIC. Castellón.

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS

El presente proyecto tiene como objetivo general la optimización del cultivo intensivo de la almeja en criadero. Para abordar este objetivo el proyecto se separa en dos subproyectos con sus consiguientes objetivos.

SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA EN CRIADERO

El presente subproyecto planteaba la optimización del cultivo de la almeja fina "*Ruditapes decussatus*" abordando diferentes puntos clave como son:

- Determinar los criterios de calidad de las puestas: selección de reproductores, optimización del acondicionamiento y la inducción a la puesta
- Pruebas de alimentación en cultivos larvarios: perfil bioquímico de las microalgas
- Identificación de la flora microbiana asociada a mortalidades presentes en las diferentes fases del cultivo: control integral del criadero, circuito de agua, fitoplancton, reproductores y cultivos larvarios

SUBPROYECTO 2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LAS REPOBLACIONES

- Identificación de marcadores genéticos en la almeja: marcadores microsatélite, caracterizados por mostrar un polimorfismo elevado.
- Caracterización genética de los bancos naturales
- Comparación de la variabilidad genética de los bancos naturales y de la semilla obtenida de progenitores procedentes del medio natural
- Seguimiento de la incidencia de las repoblaciones en el medio natural
- Conocer la dinámica de reproducción de los reproductores en el criadero, mediante análisis de paternidades, con el fin de aportar pautas a seguir en el manejo de la semilla producida

2.2. METODOLOGÍA

SUBPROYECTO 1:

Recolección de los reproductores de diferentes bancos naturales en las comunidades autónomas participantes en el proyecto.

Cálculo de los índices de condición visceral y gonadal.

Determinación del grado de madurez gonadal mediante estudios de histología clásica.

Análisis de la composición bioquímica de la gónada.

Condiciones de estabulación en el criadero para el acondicionamiento de los reproductores, de diferentes procedencias y en diferentes épocas del año.

Métodos de inducción a la puesta: diferentes recipientes y distintos tratamientos. Determinación de la composición bioquímica de los huevos.

Análisis de la calidad del fitoplancton producido en diferentes sistemas.

Pruebas en los cultivos larvarios: densidades de cultivo, tipos de tanque, sistemas de fijación, comparación de diferentes dietas, efecto del ayuno en los primeros días de cultivo, estudio de la tasa de ingestión y composición bioquímica de las larvas. Seguimiento de los cultivos mediante el control del crecimiento de las larvas y cálculo de mortalidades.

Puesta a punto de un protocolo de control de la microbiota asociada a un criadero de moluscos, mediante la determinación de los puntos críticos de recogida de muestras tanto del circuito del agua, fitoplancton, reproductores y cultivo larvario. Siembras en placa con diferentes medios de cultivo: Agar Marino (medio general para bacterias marinas) y TCBS (medio específico para bacterias del género *Vibrio*).

Pruebas de depuración de reproductores durante el acondicionamiento y previas al desove. Efecto de uso de antibióticos en los cultivos larvarios y metamorfosis.

SUBPROYECTO 2:

Recolección de muestras: de bancos naturales de las comunidades autónomas de Cantabria, Asturias, Galicia, Andalucía y Cataluña; lotes de reproductores procedentes de bancos naturales de Asturias y Galicia y semilla producida en criadero y banco natural de Galicia antes y después de repoblar.

Extracción de ADN. Desarrollo de marcadores microsatélites mediante análisis de microsatélites heterólogos y construcción de genotecas enriquecidas en motivos microsatélite.

Diseño de PCR multiplex.

Cálculo de estimas de variabilidad genética en loci microsatélites. Cálculo de estimas de diferenciación poblacional en base a loci microsatélite.

Análisis de marcadores basados en polimorfismos de restricción (RFLP) y de longitud en intrones. Cálculo de estimas de variabilidad genética en marcadores de intrones. Cálculo de estimas de diferenciación poblacional en base a marcadores de intrones.

Asignación de paternidades. Cálculo de estimas de tamaño efectivo del stock de reproductores e incremento de endogamia.

2.3. RESULTADOS

SUBPROYECTO 1:

- La mayoría de los acondicionamientos llevados a cabo (94%) dieron como resultado la madurez y desove de los reproductores, aunque el tiempo necesario varió dependiendo sobre todo de la época del año en que se acondicionen y de la temperatura del agua del tanque. En general, se consiguió adelantar la maduración gonadal respecto al medio natural, este adelanto fue de tres meses en el mejor de los casos.

El éxito del acondicionamiento no dependió tanto de aspectos técnicos como son el tipo de tanque o el flujo de renovación del agua como de otros factores. Así la tasa de renovación del agua varió entre los 20 y 60 litros por hora, y también se consiguieron acondicionamientos en tanques en circuito cerrado y con renovación total del agua cada dos días. El volumen de los tanques puede ser desde los más pequeños de 20, 40 y 60 litros hasta los más grandes de 150-200 litros, siendo éstos los utilizados mayoritariamente.

De los factores que intervienen en el acondicionamiento, el estado gametogénico inicial de los reproductores (que depende sobre todo de la época del año que se recogen y la zona geográfica) y la temperatura son más determinantes en el buen desarrollo del acondicionamiento que el tipo y cantidad del alimento suministrado.

El rango de temperaturas usadas en el acondicionamiento se mantuvo entre 17-20°C. A mayor temperatura más corto es el tiempo necesario para que los reproductores alcancen la madurez sexual. Aunque en algunos casos la temperatura elevada puede hacer que existan diferencias en el grado de maduración entre los individuos del mismo acondicionamiento. La cantidad de alimento suministrado varió entre raciones del 2 y 10% en peso seco de microalgas respecto al peso seco de los reproductores.

El método más exacto para determinar la madurez de la gónada es el estudio histológico del tejido gonadal. Aunque también aportan información los diferentes índices de condición que relacionan los pesos frescos y secos de la víscera y la gónada con el peso total del individuo o de las valvas.

De todos ellos el más fácil y rápido para calcular, al no tener que diseccionar los individuos y tampoco necesitar procesamiento alguno, es el índice de condición somático fresco que relaciona el peso fresco de la víscera con el peso fresco total. Este es un índice válido para determinar el estado de madurez de la gónada acompañándolo de la observación al microscopio de un frotis gonadal.

Al inicio de los acondicionamientos la mayoría de las almejas están en un estado de reposo y/o inicio de la gametogénesis, con unos valores del índice de condición somático entre 22 y 28%. A medida que avanza el acondicionamiento este índice va aumentando hasta alcanzar en algunos casos una subida del 80%.

Los carbohidratos y lípidos son los componentes bioquímicos de la gónada que más varían durante el acondicionamiento, los primeros disminuyen y los segundos aumentan según avanza el acondicionamiento. Los lípidos además son los componentes que presentan mayores diferencias entre machos y hembras,

siendo estas diferencias más altas conforme avanza el acondicionamiento y los valores más elevados se dan siempre en las hembras.

A nivel de los ácidos grasos analizados, se produce también un aumento de todos ellos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) durante el acondicionamiento.

- La técnica empleada para la inducción a la puesta por “choque térmico” da buenos resultados para esta especie, llegando a ser positiva hasta en el 89% de los intentos, teniendo en cuenta determinados aspectos:

El lugar para llevar a cabo la inducción debe ser una zona del criadero tranquila, evitando factores estresantes que pueden favorecer que las almejas dejen de sifonar y que la estimulación no de buenos resultados.

Es preferible realizar la inducción en los mismos tanques donde están estabuladas las almejas, en lugar de inducir las en recipientes con un volumen de agua más pequeño.

Las diferencias entre las temperaturas mínima y máxima empleadas en la inducción, para que sean efectivas, tienen que ser de al menos 10°C. Los rangos empleados dependerán de las temperaturas del medio natural y están entre 10-15°C de mínimas y 24-28°C de máximas.

La exposición de los reproductores a un periodo en seco y temperatura ambiente previo a la inducción favorece el éxito de la misma.

La composición bioquímica de los ovocitos presenta como componentes mayoritarios las proteínas (con valores desde un 10% hasta un 74,5%), seguidas de los lípidos (desde un 6,4% a un 11,96%).

Los ácidos grasos saturados (SAT) en la mayoría de los ovocitos estudiados, presentan los valores más altos (del 22,51% al 46,26%); destaca también el alto contenido en monoinsaturados (MUFA). De los poliinsaturados destacan los ω 3 que, salvo en algún caso excepcional, presentan cantidades mayores (de 11,95% a 21,58%) que los observados para los ω 6 (de 5,76% a 15,4%).

- El rango de temperatura utilizado en los cultivos larvarios, se mantuvo entre 18 y 22°C. No se comprobaron diferencias notables de unas temperaturas a otras, si bien el crecimiento de las larvas fue algo más bajo con las temperaturas inferiores. Si se aumenta la temperatura de cultivo el crecimiento larvario se acelera, pero si es demasiado alta conlleva que se acelere el metabolismo y haga que las larvas no den acumulado suficientes reservas energéticas para pasar con éxito la etapa de metamorfosis.

Se emplearon diferentes tanques en el cultivo larvario y se observó que los tanques de polietileno con base plana ofrecen mejores resultados, tanto para el cultivo larvario como para la posterior etapa de fijación, sobre todo en lo referente a la supervivencia. Aunque se necesitaría realizar más estudios sobre este aspecto.

La densidad de cultivo larvario mayormente utilizada fue de 5 larvas por ml, aunque en determinados cultivos se vio que el utilizar densidades menores aumentaba la supervivencia.

En general los resultados en cuanto a la supervivencia en el cultivo larvario son muy variables y los factores que intervienen en el mismo (tipo de tanque, nº de

larvas, temperatura del agua, alimentación y manejo del propio cultivo) no están directamente relacionados con la supervivencia, excepto las mortalidades masivas y puntuales que acaban con todo un cultivo en pocos días, y que normalmente se pueden asociar a la aparición de patógenos vibriales.

- Comparando la composición bioquímica del fitoplancton cultivado en matraz y muestreado en distintas épocas del año y con diferentes días de cultivo, se observa que el fitoplancton no tiene variaciones en cuanto a los días de cultivo, en cambio, respecto a la época del año, presentan variaciones todas las especies excepto T-Iso, a pesar de llevarse a cabo los cultivos en una cámara en condiciones controladas. Estas variaciones afectan en algunas especies sobre todo al valor de los carbohidratos y los lípidos.

En la composición bioquímica del fitoplancton producido en un sistema continuo, se observa que las proteínas y lípidos son los componentes mayoritarios. T-Iso tiene el porcentaje más alto en proteínas (48%) y Paulova luteri, lo tiene en los lípidos (42%).

Los diferentes sistemas de cultivo de fitoplancton dan como resultado microalgas con distinta composición bioquímica, lo que conlleva una variación en su calidad nutritiva, esto implica que los resultados en los diferentes cultivos larvarios, serán también distintos.

- En la experiencia de comparación de dietas diferentes en la alimentación larvaria, las larvas alimentadas con una dieta de Isochrysis+Paulova son las que menos crecen, alcanzando una talla de $201 \pm 10 \mu\text{m}$ a los 22 días de cultivo. Las larvas alimentadas sólo con Chaetoceros muelleri, son las que mayor talla alcanzan cuando llegan a pediveliger ($230 \pm 14 \mu\text{m}$). La supervivencia larvaria durante toda la experiencia fue similar en las dietas que contienen C. muelleri, tanto la dieta mixta de Isochrysis, Paulova y Chaetoceros, como la dieta exclusiva de C. muelleri, mientras que la dieta que no contiene esta especie presentó valores más bajos.

Cuando las larvas son sometidas a ayuno al principio de su desarrollo, las proteínas y los lípidos totales son las fracciones bioquímicas que más se consumen durante los primeros días. En caso de necesidad, las larvas son capaces de soportar el ayuno durante los cuatro primeros días del desarrollo larvario, sin que ello suponga un agravio para el cultivo, y pudiendo recuperar su condición una vez que se inicie la alimentación. Sin embargo, mantenerlas seis o más días sin comer provoca que no sean capaces de recuperar su condición cuando se inicia la alimentación, y ello compromete el rendimiento del cultivo.

En la experiencia del cultivo larvario donde se experimentaron tres concentraciones (alta, media y baja) de fitoplancton, no se observaron diferencias en las tasas de ingestión entre unas concentraciones y otras. Durante la primera semana del cultivo larvario, el consumo de fitoplancton varía entre las 2000 y 4000 células por larva al día. La segunda semana la tasa aumenta, rondando las 6000 células de consumo diario. En la tercera semana la tasa de ingestión muestra los valores más altos de todo el cultivo, situándose en torno a las 7000 células al día. La cuarta y última semana, cuando las larvas comienzan a prepararse para la fijación, el consumo disminuye obteniéndose valores en torno a las 5000 células. El crecimiento y la supervivencia larvaria fue similar para las tres concentraciones ensayadas, donde se obtuvieron más diferencias fue posteriormente en el proceso de preengorde de la semilla, donde se observó que

la semilla que provenía de las larvas alimentadas a baja concentración tuvo una supervivencia inferior a las otras dos concentraciones.

Los cultivos larvarios que tuvieron más supervivencia al llegar a la metamorfosis, según la composición bioquímica de las larvas, fueron aquellos en los cuales las larvas D presentaban mayores contenidos en lípidos totales, en cambio no se observó relación de la composición en ácidos grasos con la supervivencia. La energía necesaria durante el período lecitotrófico (sin alimentación exógena) prácticamente se soporta con los siguientes ácidos grasos: 14:0; 16:0; 18:0; 16:1n-7; 18:1n-9; 18:1n-7 y 20:5n-3.

Las larvas de 14 días que alcanzan mayor supervivencia presentan alto contenido en: MUFA, PUFA, n-3 y n-9. Estas larvas y postlarvas respecto a la composición en ácidos grasos, presentaron una dispersión amplia con las larvas D.

- El seguimiento de la calidad microbiológica de los diferentes criaderos que participaron en el proyecto, después de analizar los resultados obtenidos de los muestreos realizados en los puntos críticos, indican que la calidad microbiológica del agua es adecuada para su uso en los cultivos, siendo nulo en crecimiento de vibrios y en valores normales el crecimiento de bacterias marinas heterótrofas. Los recuentos habituales de bacterias marinas heterótrofas en el fitoplancton estuvieron alrededor de 103 – 107 ufc/mL. Los vibrios presentaron valores muy bajos, desde la no detección hasta un máximo de 103 ufc/mL. Los recuentos son inferiores o nulos en el fitoplancton cultivado en matraces respecto a las bolsas cultivadas en cerrado.

En los criaderos donde se hizo la sustitución del fitoplancton de bolsa por el del cultivo continuo, se mostró una mejora sustancial en la calidad microbiológica del alimento.

Según el origen de los reproductores la carga bacteriana es diferente, llegando incluso en los reproductores que llegan al criadero más cargados, a ser una causa de mortalidades en los cultivos larvarios. Los tratamientos de depuración de reproductores en el acondicionamiento y antes de la inducción al desove rebajan esta carga bacteriana mejorando el rendimiento de los cultivos larvarios.

En los cultivos larvarios, tanto en las muestras de AM como en las de TCBS, se observa, en un primer momento, una alta presencia de bacterias y vibrios, descendiendo para presentar un repunte en la fase de fijación y postlarva. Analizando los controles bacteriológicos de varias experiencias de cultivo larvario y contrastándolos con las supervivencias, recuentos altos en TCBS dan como resultado que las larvas no completan el desarrollo. Se obtuvo una colección bacteriana que se caracterizó mediante métodos bacteriológicos clásicos en placa y tubo. El estudio se centró en aquellas bacterias fermentativas, presuntamente pertenecientes al género *Vibrio*, al que pertenecen la mayoría de los patógenos de larvas de bivalvos.

Con el uso de antibiótico en los cultivos larvarios la carga de bacterias marinas totales del agua de cultivo no mostró diferencias entre el cultivo con antibiótico al sin antibiótico, el efecto sí se reflejó en los recuentos de vibrios ya que esto sólo se detectaron en el agua de cultivo con antibiótico, sin embargo, este efecto no se observó en las larvas, ya que presentaron vibrios en ambos cultivos.

Se hicieron estudios preliminares del uso de otro tipo de antibióticos en el cultivo de almeja japonesa que nos servirá para iniciar estudios el uso de estos antibióticos con la almeja fina

- En el preengorde en criadero se considera como idónea la densidad de 250.000 unidades por tamiz para la fijación y, posteriormente, 200-250 g por tamiz hasta alcanzar la talla en que quedan retenidas en malla de 2-3 mm. En estas condiciones alcanzan supervivencias elevadas, en torno al 100%, y entre 60-300 días hasta alcanzar talla de tamiz 2-3 mm.

En el preengorde en el exterior el sistema de flujo invertido permite aumentar la producción y disminuir el mantenimiento. Las cargas con las que se trabaja son de entre 1,5 y 3 kg de semilla por tanque de polietileno. En estas condiciones se han logrado supervivencias entre el 70 y el 90%, precisando la semilla entre 180 y 360 días hasta alcanzar la talla de 10-12 mm, considerada adecuada para su liberación en el medio (repoblación).

SUBPROYECTO 2:

- Al analizar en la almeja fina de 9 loci microsatélites descritos en *R. philippinarum* se observó ausencia de amplificación, amplificaciones inconsistentes o ausencia de polimorfismo por lo que la estrategia de aislar marcadores microsatélite a partir de loci heterólogos resultó infructuosa. No obstante, la construcción de dos genotecas enriquecidas en los motivos ATC y CTGT permitió identificar 25 loci microsatélite polimórficos.

Para reducir el coste del análisis de los marcadores microsatélite, se trataron de optimizar PCR multiplex que permitiesen amplificar varios marcadores en una reacción de PCR. Tras valorar distintas agrupaciones de los 25 marcadores, se consiguió la amplificación simultánea de 8 loci (RdM8) por un lado y de 6 por otro (RdM6).

- Se obtuvieron estimas de variabilidad genética de las poblaciones naturales por locus y población para 14 loci microsatélite. El número de alelos por locus varió entre 6 y 18 y la riqueza alélica entre 3,641 y 12,950. En las localidades, el número medio de alelos por locus fue de 7,571 a 8,714 y la riqueza alélica por locus de 7,102 a 8,227, observándose el menor valor en Cambados y el mayor en Delta del Ebro. La heterocigosidad media observada y esperada varió de 0,614 (Cambados) a 0,701 (Pontejos) y de 0,629 (Rio Piedras) a 0,729 (Delta del Ebro), respectivamente. Aunque el nivel de variabilidad genética es similar en todas las localidades, en la variación observada Cambados muestra mayoritariamente los valores más bajos y Delta del Ebro los más altos.

Las proporciones genotípicas de 121 de las 126 combinaciones locus-localidad no mostraron diferencias significativas con respecto a lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg tras la corrección secuencial de Bonferroni. Todos los loci, excepto tres, se ajustaron a lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg en todas las localidades. Los que no lo hicieron mostraron desviaciones significativas en una o tres localidades. En todos los casos las desviaciones se debieron a un déficit en el número de heterocigotos respecto a lo esperado, debido probablemente a la existencia de alelos nulos.

- Se evaluó la diferenciación poblacional en base a 13 loci microsatélites. El valor del estadístico FST fue significativamente distinto de cero ($FST = 0.0259$) indicando la existencia de diferenciación genética entre las localidades. Los valores FST por pares de localidades indican que Delta del Ebro es significativamente distinta al resto. Las localidades de Asturias y Cantabria no mostraron diferencias significativas entre sí pero sí lo hicieron con las demás localidades. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las localidades de Galicia ni entre las de Andalucía pero al comparar localidades de ambas comunidades las diferencias son significativas. En conjunto, la diferenciación genética observada es baja entre Cantábrico-Galicia y Galicia-Andalucía y moderada entre Cantábrico-Andalucía pero alta entre Delta del Ebro y las demás localidades. Los árboles neighbor-joining elaborados en base a los valores FST o distancia genética de Nei reflejan que Delta del Ebro es la localidad más diferenciada genéticamente y que las demás localidades se agrupan por regiones, Cantábrico, Galicia y Andalucía, siendo las de Galicia las más estrechamente relacionadas con las otras localidades atlánticas. La aplicación de

tests de diferenciación alélica por pares de localidades aportó resultados similares, detectándose diferencias significativas en 1-2 loci entre localidades atlánticas y en 6-10 loci entre éstas y Delta del Ebro.

El test de Mantel aplicado tanto al conjunto las nueve localidades como sólo a las localidades atlánticas reveló en ambos casos una correlación ($r = 0,7871/0,8936$) y un coeficiente de determinación ($R^2 = 0,620/0,798$) relativamente alto lo que indica que gran parte de la variación puede ser debida a un patrón evolutivo de aislamiento por distancia.

- La diferenciación genética entre localidades analizada mediante un análisis factorial de correspondencias indicó una clara separación de Delta del Ebro y Andalucía de las demás localidades. Los resultados obtenidos usando el programa Structure bajo diferentes modelos con todas las localidades o sólo las localidades atlánticas fueron similares y confirmaron la existencia de diferenciación genética, resultando sobre todo Delta del Ebro pero también las localidades de Andalucía las más diferentes genéticamente.

La caracterización genética de los bancos naturales se llevó a cabo también mediante marcadores RFLP de intrones. Los resultados obtenidos con estos marcadores fueron muy similares a los de microsatélites, con las esperables diferencias debidas a la diferente naturaleza de los dos tipos de marcadores.

El número de alelos observado en los 6 marcadores intrónicos varió entre 2 y 4. La heterozigosis media varió entre 0,394 y 0,482, y el número medio de alelos por locus lo hizo entre 2,33 y 2,67. La población de Cambados presentó los valores más bajos de variabilidad genética para los marcadores intrónicos.

Se detectó un déficit generalizado de heterocigotos. Aparte de un locus con alelos nulos que provocaban un fuerte déficit, las deficiencias de heterocigotos se concentraron en el locus Srp54 en las poblaciones de Galicia y Andalucía.

La diferenciación genética de las poblaciones fue significativa y de magnitud moderada ($F_{ST} = 0,088$). Las diferencias entre pares de poblaciones fueron significativas en casi todos los casos, excepto los que implicaban comparaciones entre las poblaciones del Cantábrico y entre las dos poblaciones andaluzas, y presentaron un rango de variación de 0 a 0,250. La población más diferenciada fue la del Delta del Ebro, en concordancia con estudios previos, con un rango de F_{ST} de 0,156 a 0,293. Las poblaciones restantes presentaron F_{ST} variable entre 0 y 0,153. El ajuste de un modelo de aislamiento por la distancia no fue significativo

El estudio de las distancias genéticas (F_{ST}) entre poblaciones mediante árboles obtenidos por el método de neighbour-joining sugiere una mayor distancia de las poblaciones del Delta del Ebro y de las rías gallegas.

El análisis de la estructura genética mediante métodos bayesianos dio lugar al agrupamiento de los individuos en tres grupos genéticos con una fuerte asociación geográfica. Uno de ellos fue mayoritario en el Delta del Ebro y estaba casi ausente del resto de poblaciones. Las poblaciones atlánticas mostraron 2 grupos adicionales, uno de los cuales era más abundante en las poblaciones de las rías gallegas. Un análisis en el que se incluyeron 7 poblaciones adicionales procedentes de un estudio anterior (dos mediterráneas y 5 atlánticas), permitió encontrar una pauta de diferenciación específica de las poblaciones de las Rías Baixas y de las costas del sur de Portugal (a falta de muestras intermedias) que

sugieren una diferenciación específica de las poblaciones de almeja de la fachada atlántica de la Península Ibérica.

- Para evaluar los efectos genéticos de la cría en cautividad se cuantificó en base a microsatélites la variabilidad genética existente en 4 lotes de reproductores procedentes de bancos naturales (2 de Asturias y 2 de la localidad gallega de Cambados) y en la semilla generada a partir de ellos para compararla con la de los bancos naturales de donde proceden y que se repoblaron a partir de ella. La variabilidad de los lotes de reproductores es muy similar al de la población natural de la que proceden en todos los parámetros estimados. Sin embargo, en las muestras de semilla en general se aprecia una menor variabilidad. Atendiendo a la riqueza alélica, por no depender del tamaño muestral, se observan reducciones del 9-21% respecto a los reproductores y del 10-21% respecto al banco natural.

Al estimar el parámetro de diferenciación genética FST en las muestras de Asturias se observa que no existen diferencias significativas entre las muestras naturales y los stocks de reproductores derivado de ellos, ni entre las dos muestras de semilla procedentes de los reproductores del Eo, sin embargo sí existen diferencias significativas al comparar las muestras de semillas con los lotes de reproductores de los que proceden y las poblaciones naturales donde van a ser sembradas. Las diferencias detectadas en el parámetro FST aparecen también reflejadas en un árbol neiborgh-joining elaborado con la distancia genética de Nei.

- En el caso de las muestras analizadas de Cambados, no se observa diferenciación genética significativa en lo que respecta al banco natural, el lote de reproductores 1 y la semilla obtenida de este lote. Sin embargo, existen diferencias significativas entre la semilla producida por el lote de reproductores 2 y el banco natural. Los dos lotes de reproductores proceden del mismo banco y no muestran diferencias entre sí pero la semilla que produjeron resulta significativamente diferente. Las relaciones inferidas en un árbol neiborgh-joining con la distancia genética de Nei concuerdan con los datos de FST, destacando la semilla 2 por estar más alejada del banco natural que las demás muestras.

Globalmente, la diferenciación genética observada entre banco natural y la semilla producida se debe a la dinámica de reproducción de los reproductores en criadero más que a que los reproductores no representen la variabilidad genética del medio natural.

Los efectos genéticos del proceso de producción de semilla en el criadero también se examinaron mediante análisis de paternidades. Atendiendo a la composición genotípica y niveles de variabilidad de 14 loci microsatélite de los lotes de reproductores (número medio de alelos por locus, entre 6,130 y 8,14, heterocigosidades medias observadas, entre 0,613 y 0,641 y PIC, entre 0,5998 y 0,6385), las simulaciones realizadas mediante el programa Cervus indican que, tanto utilizando un criterio estricto (95% de nivel de confianza) como uno más relajado (80%), las probabilidades de asignación de un descendiente a la pareja real de parentales varían entre un 99,4% y un 100% en los 4 lotes. La proporción de descendientes a los que se les asignó una pareja de parentales osciló entre un 25 y un 86,57% debido en gran medida a que solo en un lote pudo disponerse de todos los reproductores.

Se analizó la contribución a la descendencia de los parentales identificados y en los 4 lotes ocurre que no todos los reproductores analizados participan en la

reproducción, el porcentaje oscila entre el 42 y el 85%. La proporción de sexos en los parentales se encuentra relativamente equilibrada excepto en el lote Cambados 2 donde el número de machos duplica al de hembras. Un aspecto común a todos los lotes es que tanto las hembras como los machos y las familias muestran una contribución desigual. También se observa una baja representación de las posibles familias (15-37%).

También se obtuvieron estimas de tamaño efectivo e incremento de endogamia asumiendo que los individuos analizados son una muestra aleatoria del total de reproductores utilizados cuando no se dispuso de todos los reproductores del lote. En todos los casos, el tamaño efectivo estimado resultó muy inferior al número real de progenitores utilizados, representado solamente entre un 3 y un 35%. A excepción de la estimación realizada un lote de reproductores de Asturias (Villaviciosa, 1,4%), el incremento de endogamia que se generaría en una sola generación de reproducción en cautividad (4,3-7,3%) es muy superior al generalmente recomendado desde un punto de vista genético (1%) para que las poblaciones no sufran procesos de depresión endogámica. Los incrementos de endogamia y reducciones de tamaño efectivo que se observan se deben al número de reproductores que interviene en la reproducción pero sobre todo a su contribución asimétrica.

- El seguimiento de la repoblación se abordó en el banco natural de Cambados y para ello se analizaron 14 loci microsatélite en dos muestras adicionales, una muestra de almejas con talla similar a la semilla recogida justo antes de la siembra y otra recogida en el área repoblada diez meses después de la siembra, además de los reproductores utilizados para la obtención de semilla y una muestra de almejas del banco natural de tamaño aleatorio, incluidas en análisis previos. El nivel de variabilidad genética de la semilla sembrada resultó similar a la de la muestra de almejas de talla similar a la semilla, sin embargo, en la muestra recogida después de la repoblación se observa mayor variabilidad en cuanto al número de alelos por locus y a la riqueza alélicas. Al comparar los valores FST, destaca la existencia de diferenciación genética significativa en la comparación de semilla y muestra de almejas de talla similar a la semilla, así como en todas las comparaciones que incluyen la muestra de repoblación. Las diferencias entre el banco repoblado y las demás muestras fueron igualmente evidentes en un árbol neighbour-joining elaborado con la distancia genética de Nei

2.4. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN

SUBPROYECTO 1:

- Para llevar a cabo el cultivo en criadero de la almeja fina, se puede partir de reproductores que ya lleguen maduros del medio natural, recogidos entre mayo y agosto, o bien traerlos al criadero en otra época y acondicionarlos hasta conseguir su madurez. No existen diferencias entre la calidad de las puestas obtenidas por uno u otro método.

Con las técnicas de acondicionamiento empleadas en este proyecto, se consiguió adelantar la época de puesta respecto al medio natural, con lo cual se amplía el período de obtención de desoves en el criadero desde 4 a 7 meses.

Para garantizar el éxito del acondicionamiento, los reproductores deben estar por lo menos en la fase de inicio de la gametogénesis. A mayor índice de condición y mayor cantidad de carbohidratos que presenten los reproductores al inicio del acondicionamiento, más corto será este período.

Los dos factores que más influyen en el acondicionamiento son en primer lugar la temperatura y luego la alimentación.

Los componentes bioquímicos que más se movilizan durante el acondicionamiento son los lípidos y los carbohidratos; los primeros aumentan su concentración y los segundos la disminuyen.

- Se consiguió mejorar el éxito de la inducción a la puesta por “choques térmicos” sometiendo los reproductores a un período previo en seco y temperatura ambiente. La diferencia de temperatura aplicada en los choques térmicos debe ser al menos de 10°C. Es preferible realizar la inducción en los mismos tanques donde están estabuladas las almejas, en lugar de inducir las en recipientes con un volumen de agua más pequeño.

- La composición bioquímica del fitoplancton no tiene variaciones en cuanto a los días de cultivo que lleve cuando se cosecha, pero si las presenta respecto a la época del año, incluso cuando el cultivo se realiza en una cámara isoterma en condiciones controladas. Estas variaciones afectan sobre todo al valor de los carbohidratos y los lípidos. Estas variaciones se dan también entre el fitoplancton producido en diferentes sistemas. Cada criadero participante en el proyecto tiene sus propios sistemas de producción de fitoplancton, por eso es importante que cada uno conozca el perfil bioquímico de sus microalgas para elaborar dietas con la mayor calidad posible.

- Los mejores resultados en los cultivos larvarios se obtuvieron cuando en la dieta suministrada está incluida la microalga *Chaetoceros muelleri* u otra alga con un perfil bioquímico similar.

En caso de necesidad, las larvas son capaces de soportar el ayuno durante los cuatro primeros días del desarrollo larvario, sin que ello suponga un agravio para el cultivo, y pudiendo recuperar su condición una vez que se inicie la alimentación.

Durante el cultivo larvario, el consumo de fitoplancton va aumentando según avanza el cultivo hasta que se acerca el proceso de la metamorfosis y la fijación de las larvas, en este momento (a las cuatro semanas de cultivo), el consumo disminuye hasta valores similares a la segunda semana de cultivo.

Las larvas D que presentan un mayor contenido en lípidos totales, alcanzan mayor supervivencia en el cultivo larvario.

- La calidad microbiológica del agua de los criaderos participantes en el proyecto es buena para realizar el cultivo de moluscos como la almeja fina. La principal fuente de entrada de bacterias a las instalaciones y los cultivos larvarios es por los propios reproductores y por el cultivo de fitoplancton, por eso es necesaria la depuración de las almejas usadas como reproductores y extremar las condiciones higiénico-sanitarias en la manipulación de los cultivos de fitoplancton. El control de la microbiota presente en un criadero es una actividad indispensable para asegurar el éxito de los cultivos.

SUBPROYECTO 2:

- Se identificó un total de 25 microsatélites polimórficos, aportando por tanto marcadores genéticos necesarios para el desarrollo del proyecto y también para futuros estudios.

Se optimizaron dos PCR múltiplex que permiten examinar simultáneamente 6 y 8 loci microsatélite, reduciendo el coste económico y el tiempo de los análisis genéticos.

- Todos los bancos naturales analizados muestran niveles de variabilidad genética similares pero en la variación observada las localidades gallegas de Cambados y Redondela muestran mayoritariamente los valores más bajos en alguno de los tipos de marcadores estudiados.

Todos los análisis realizados ponen de manifiesto la existencia de diferenciación genética significativa entre las localidades estudiadas. Aunque existen excepciones, las localidades son genéticamente homogéneas por regiones pero existen diferencias entre regiones. Las localidades mediterráneas muestran la mayor diferenciación respecto a las demás. Éstas constituyen grupos genéticamente diferenciados de composición variable dependiendo del tipo de marcador empleado. No obstante, a efectos de gestionar el recurso en las costas españolas, Cantábrico, Galicia, Andalucía y especialmente el Mediterráneo deberían considerarse regiones genéticamente diferenciadas.

- La semilla producida muestra una reducción de la variabilidad genética respecto a los reproductores y al banco natural de donde proceden los reproductores. También muestra en la mayoría de los casos una diferenciación genética significativa respecto al banco natural debida a la dinámica de reproducción de los reproductores en el criadero.

-

- Análisis de paternidades basados en microsatélites identificados en este proyecto han permitido identificar cambios genéticos producidos durante el proceso de cultivo de criadero. Lotes de reproductores de tamaños $N = 49-150$ mostraron tamaños efectivos de tan solo 1,53-53,2, lo cual va asociado a un incremento de endogamia (1,4-7,3%) superior al recomendado (1%).

- Los cambios genéticos producidos en el criadero se deben a que no todos los reproductores participan en la reproducción y sobre todo a una contribución desigual tanto a nivel individual como por parejas. Ambos aspectos deberían ser tenidos en cuenta en el manejo de los reproductores para evitar los efectos negativos de la endogamia.

- El nivel de variabilidad y diferenciación genética del banco natural antes y después de repoblar indican que la semilla producida en el criadero persiste en el medio natural después de la siembra, no obstante, es necesario realizar estudios adicionales para evaluar más precisamente el éxito y el impacto genético de esta práctica.

2.5. VALORACIÓN

- Con los resultados obtenidos en este proyecto se han conseguido logros importantes en diferentes fases de cultivo de la almeja fina, especie cuyo cultivo reviste especial complejidad. Así en el acondicionamiento de los reproductores se estandarizó el protocolo comprobando los factores que más influyen para conseguir la madurez en épocas diferentes a las del medio natural. En la inducción a la puesta se han mejorado los sistemas para conseguir desoves ya que había dificultades en su obtención.

En los cultivos larvarios se han mejorado algunos aspectos, se obtuvieron conocimientos nuevos sobre la calidad del alimento y la importancia de los tipos de tanques aunque los resultados en cuanto a la obtención de cantidades de semilla fue muy variable a lo largo del desarrollo del proyecto.

El conocimiento de la microbiología es la primera vez que se aborda en los criaderos de moluscos como un estudio indispensable, se han marcado los puntos críticos en los diferentes criaderos y un protocolo de actuación.

Con todo esto se han unificado protocolos de cultivo por los distintos grupos participantes.

En este proyecto se realizó un estudio genético exhaustivo que abarcó desde el desarrollo de marcadores genéticos, las herramientas necesarias para los análisis genéticos, hasta la obtención de datos esenciales para la gestión del recurso tanto en el medio natural como en el criadero.

Se identificó, por primera vez en *R. decussatus*, un número importante de marcadores microsatélites (25) que podrán ser utilizados por la comunidad científica en futuros estudios genéticos relacionados con la acuicultura y otros campos como la conservación. Por otra parte, al haber optimizado dos PCR multiplex se proporciona una herramienta que facilita el análisis de los marcadores desarrollados

Se aportan estimas robustas del nivel de variabilidad genética presente en los bancos naturales de la Península Ibérica, así como evidencias de la existencia de diferenciación genética entre las localidades examinadas, especialmente entre las del Mediterráneo y del Atlántico que deberían ser tenidas en cuenta en la gestión del recurso.

Por primera vez en esta especie se hace una valoración genética de la producción de semilla en criadero, aportándose datos de las diferencias genéticas entre la semilla producida, reproductores y banco natural, así como estimas, basadas en análisis de paternidades, de la contribución de los reproductores a la semilla producida. Se identifican cambios genéticos debidos la dinámica de reproducción de *R. decussatus* en criadero que señalan aspectos relevantes que deben ser mejorados en el criadero.

Se aportan evidencias indirectas de que la semilla sembrada persiste en el medio natural y se pone de manifiesto la necesidad de continuar los estudios del seguimiento de la repoblación.

Se consolidaron los grupos de investigadores que trabajan en criaderos de moluscos en las distintas comunidades autónomas y da pie a seguir trabajando en conjunto en bien de la sostenibilidad de los recursos marisqueros.

2.6. DIFUSIÓN

Se presentaron resultados referentes a los diversos contenidos del proyecto en varios congresos de acuicultura regionales, nacionales e internacionales mediante la presentación de diferentes trabajos:

- Foros dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas (6 trabajos)
- II Symposium de Acuicultura Mediterránea (1 trabajo)
- Congresos Nacionales de Acuicultura (9 trabajos)
- Aquaculture Europe (4 trabajos).

Se han defendido 4 Trabajos Fin de Máster en las Universidades de A Coruña, Oviedo y Santiago de Compostela.

Se ha defendido una Tesina de licenciatura en la Universidad de Oviedo.

Actualmente está en prensa el libro “Clam fisheries and aquaculture” en el cual se participa elaborando dos de sus capítulos: Clam reproduction y Clam hatchery and nursery culture in Spain.

Se va a presentar una Tesis Doctoral realizada dentro del marco de este proyecto, sobre el cultivo de la almeja fina que será defendida en la Universidad de Santiago de Compostela.

Se presentarán más resultados en otros congresos y se redactarán artículos para su publicación en revistas recogidas en el ICR.

2.7. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

El proyecto se desarrolló con normalidad.

INFORME FINAL EXTENSO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TITULO: Optimización del cultivo intensivo de la almeja e identificación de marcadores genéticos para el seguimiento de las repoblaciones

FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio: 2008

Finalización: 2011 (Prórroga sin financiación)

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: Dorotea Martínez Patiño

Organismo/ Centro: Consellería do Medio Rural e do Mar

Departamento: CIMA-Ribadeo

Teléfono: 982-889404

Fax: 982-889419

Correo electrónico: mptea@cimacoron.org

Dirección postal completa: Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo. Lugo

PARTICIPANTES por cada Comunidad Autónoma

GALICIA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Publico de I+D

Nombre: Consellería do Medio Rural e do Mar

CIF: S-1511001-H

Nombre Representante Legal: Susana Rodríguez Carballo

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Martínez Patiño

Nombre: Dorotea

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889404

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: mptea@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo. Lugo. España

Apellidos: Nóvoa Vázquez

Nombre: Susana

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889405

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: snovoa@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo. Lugo. España

Apellidos: Ojea Martínez

Nombre: Justa

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889407

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: justaom@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo. Lugo. España

Apellidos: Da Costa González

Nombre: Fiz

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889413

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: fiz@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo. Lugo. España

Apellidos: Aranda Burgos

Nombre: José andrés

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889414

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: aranda.jose@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillan s/n. 27700 Ribdeo.Lugo. España

Apellidos: Cerviño Otero

Nombre: Ana

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889414

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: anacervi@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillan s/n. 27700 Ribdeo.Lugo. España

Apellidos: Fernández Pardo

Nombre: Alejandra

Organismo: Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas. CIMA

Departamento: CIMA-Ribadeo

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982-889414

Fax.: 982-889419

Correo electrónico: fernandez.alejandra@cimacoron.org

Dirección Postal: Peirao de Porcillan s/n. 27700 Ribdeo.Lugo. España

Apellidos: Méndez Felpeto

Nombre: Josefina

Organismo: Universidade da Coruña

Centro: Facultad de Ciencias

Departamento: Departamento de Biología Celular y Molecular

Equipo: Xenomar

Teléfono: 981-167050 Ext. 2055

Fax.: 981-167065

Correo electrónico: [fina@udc.es](mailto: fina@udc.es)

Dirección Postal: Campus A Zapateira. 15071. A Coruña

Apellidos: Insua Pombo

Nombre: Ana

Organismo: Universidade da Coruña

Centro: Facultad de Ciencias

Departamento: Departamento de Biología Celular y Molecular

Equipo: Xenomar

Teléfono: 981-167050 Ext. 2138

Fax.: 981-167065

Correo electrónico: insuax@udc.es

Dirección Postal: Campus A Zapateira. 15071. A Coruña

Apellidos: Freire Álvarez

Nombre: Ruth

Organismo: Universidade da Coruña

Centro: Facultad de Ciencias

Departamento: Departamento de Biología Celular y Molecular

Equipo: Xenomar

Teléfono: 981-167050 Ext. 2030

Fax.: 981-167065

Correo electrónico: insuax@udc.es

Dirección Postal: Campus A Zapateira. 15071. A Coruña

Apellidos: Arias Pérez

Nombre: Alberto

Organismo: Universidade da Coruña

Centro: Facultad de Ciencias

Departamento: Departamento de Biología Celular y Molecular

Equipo: Xenomar

Teléfono: 981-167050 Ext. 2030

Fax.: 981-167065

Correo electrónico: insuax@udc.es

Dirección Postal: Campus A Zapateira. 15071. A Coruña

CATALUÑA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Empresa Pública I+D

Nombre: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)

CIF: Q-5855049-B

Nombre Representante Legal: Agustí Fonts Cavestani. Subdirector general

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Delgado Fernández

Nombre: Marina

Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)

Centro: Centre d'Aquicultura

Departamento: Unidad de Cultivos Acuícolas

Equipo:

Teléfono: 977-745427

Fax.: 977-744138

Correo electrónico: marina.delgado@irta.es

Dirección Postal: Ctra. Poble Nou s/n. Apdo. 200. 43540 San Carles de la Rápita. Tarragona. España

Apellidos: Pérez Larruscain

Nombre: Josu

Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)

Centro: Centre d'Aquicultura

Departamento: Unidad de Cultivos Acuícolas

Teléfono: 977-745427

Fax.: 977-744138

Correo electrónico: josu.perez@irta.es

Dirección Postal: Ctra. Poble Nou s/n. Apdo. 200. 43540 San Carles de la Rápita. Tarragona. España

Apellidos: Estévez García

Nombre: Alicia

Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)

Centro: Centre d'Aquicultura

Departamento: Unidad de Cultivos Acuícolas

Teléfono: 977-745427

Fax.: 977-744138

Correo electrónico: alicia.estevez@irta.cat

Dirección Postal: Postal: Crta. Poble Nou s/n. Apdo. 200. 43540 San Carles de la Rápita. Tarragona. España.

Apellidos: Trigo de Sousa Roque

Nombre: Ana

Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)

Centro: Centre d'Aquicultura

Departamento: Unidad de Cultivos Acuícolas

Teléfono: 977-745427

Fax.: 977-744138

Correo electrónico: ana.roque@irta.cat

Dirección Postal: Postal: Crta. Poble Nou s/n. Apdo. 200. 43540 San Carles de la Rápita. Tarragona. España.

Apellidos: Saavedra Carballido

Nombre: Carlos

Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Centro: Instituto de Acuicultura Torre de la Sal

Departamento: BCPEM

Equipo: Biología y Cultivo de Moluscos

Teléfono: 964-319500

Fax.: 964-319509

Correo electrónico: saavedra@iats.csic.es

Dirección Postal: 12595 Ribera de Cabanes (Castellón). España

ANDALUCÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Organismo Público de I+D

Nombre: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA).

CIF: S-4100689-A

Nombre Representante Legal: Francisco Javier de las Nieves López

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Moreno Escalante

Nombre: Óscar

Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Consejería de Agricultura y Pesca - Junta de Andalucía

Centro: Centro Agua del Pino

Departamento: Producción

Teléfono: 959-024922

Fax.: 959-024929

Correo electrónico: oscar.moreno@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría, s/n. 21071 Cartaya. Huelva. España

Apellidos: Ruiz Azcona

Nombre: Paz

Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Consejería de Agricultura y Pesca - Junta de Andalucía

Centro: Centro Agua del Pino

Teléfono: 959-024922

Fax.: 959-024929

Correoelectrónico: mpaz.ruiz.ext@juntadeandalucia.es; pazmanuel90@gmail.com

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría, s/n. 21071 Cartaya. Huelva. España

Apellidos: Martínez Pita

Nombre: Inés

Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Consejería de Agricultura y Pesca - Junta de Andalucía

Centro: Centro Agua del Pino

Teléfono: 959-024922

Fax.: 959-024929

Correo electrónico:

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría, s/n. 21071 Cartaya. Huelva. España

Apellidos: Palanco Sánchez

Nombre: Inmaculada

Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Consejería de Agricultura y Pesca - Junta de Andalucía

Centro: Centro Agua del Pino

Teléfono: 959-024922

Fax.: 959-024929

Correo electrónico:

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría, s/n. 21071 Cartaya. Huelva. España

ASTURIAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Administración

Nombre: Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos. Dirección General de Pesca Marítima. Centro de Experimentación Pesquera.

CIF: S-3333001-J

Nombre Representante Legal: Eva María Llera González

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Carrasco Fidalgo

Nombre: José Francisco

Organismo: Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos.

Centro: Centro de Experimentación Pesquera

Departamento: Dirección General de Pesca Marítima

Equipo: Departamento de Acuicultura.

Teléfono: 985-312711

Fax.: 985-312899

Correo electrónico: josefrancisco.carrascofidalgo@asturias.org

Dirección Postal: Avda. Príncipe de Asturias s/n. 33212 Gijón. Asturias. España.

Apellidos: Rodríguez Rodríguez

Nombre: Carmen

Organismo: Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos.

Centro: Centro de Experimentación Pesquera

Departamento: Dirección General de Pesca Marítima

Equipo: Departamento de Acuicultura.

Teléfono: 985-635020

Fax.: 985-312899

Correo electrónico: carmen.rodriguezrodriguez@asturias.org

Dirección Postal: El Muelle, 33760 Castropol. Asturias. España

Apellidos: López Ruiz

Nombre: Jacobo

Organismo: Autónomo. Asistencia Técnica.

Teléfono: 699-577867

Correo electrónico: jacobolr@yahoo.es

Dirección Postal: c/ Milagrosa, 9 – 3D. 33770 Vegadeo. Asturias.

Apellidos: Sánchez Prado

Nombre: José Antonio

Organismo: Universidad de Oviedo. Principado de Asturias

Centro: Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Departamento: Dpto. de Biología Funcional. Área Genética

Equipo: Laboratorio de Genética Acuícola

Teléfono: 985-103889 Lab. 5272

Fax.: 985-103534

Correo electrónico: jafsp@uniovi.es

Dirección Postal: Universidad de Oviedo. Dpto. de Biología Funcional. Área de Genética. Julián Clavería, s/n. 33071 Oviedo, Asturias. España

Apellidos: Blanco Linaza

Nombre: Gloria

Organismo: Universidad de Oviedo. Principado de Asturias

Centro: Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Departamento: Dpto. de Biología Funcional. Área Genética

Equipo: Laboratorio de Genética Acuícola

Teléfono: 985-106262

Fax.: 985-103534

Correo electrónico: gloriablanca@uniovi.es

Dirección Postal: Universidad de Oviedo. Dpto. de biología funcional. Área de Genética. Julián Clavería, s/n. 33071 Oviedo, Asturias. España

Apellidos: Borrell Pichs

Nombre: Yaisel

Organismo: Universidad de Oviedo. Principado de Asturias

Centro: Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Departamento: Dpto. de Biología Funcional. Área Genética

Equipo: Laboratorio de Genética Acuícola

Teléfono: 985-102746

Fax.: 985-103534

Correo electrónico: borrellyaisel@uniovi.es

Dirección Postal: Universidad de Oviedo. Dpto. de biología funcional. Área de Genética. Julián Clavería, s/n. 33071 Oviedo, Asturias. España

CANTABRIA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Organismo Público de I+D

Nombre: Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Pesca y Alimentación.

CIF: S-3933002-B

Nombre Representante Legal: Pilar Pereda Pérez

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Cigarría Álvarez

Nombre: Juan

Organismo: Grupo Tinamenor

Centro: Tinamenor, S.L.

Departamento: Criadero de moluscos

Teléfono: 942-718020

Fax.: 942-718025

Correo electrónico: moluscos@tinamenor.es

Dirección Postal: Pesues s/n. 39594 Cantabria

Apellidos: Sola Izcue

Nombre: Esperanza

Organismo: Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Ganadería

Centro: Servicio de Laboratorio y Control

Teléfono: 942-332400

Fax.: 942-332400

Correo electrónico: solae@gobcantabria.es

Dirección Postal: C/ Peña Bejo s/n 39011 Santander

Apellidos: Fernández Rabanillo

Nombre: Baldomero

Organismo: Consejería Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Ganadería

Centro: Servicio de Laboratorio y Control

Teléfono: 942-332400

Fax: 942-332400

Correo electrónico: fernandez_ba@gobcantabria.es

Dirección Postal: C/ Peña Bejo s/n 39011 Santander

Apellidos: Fernández Ruiz

Nombre: Carmen

Organismo: Consejería Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Ganadería

Centro: Servicio de Laboratorio y Control

Teléfono: 942-332400

Fax: 942-332400

Correo electrónico: fernandez_ba@gobcantabria.es

Dirección Postal: C/ Peña Bejo s/n 39011 Santander

2.- RESULTADOS TÉCNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS INICIALES

Para este proyecto de investigación se plantean dos subproyectos, que se desglosan en las siguientes tareas en relación a los objetivos a desarrollar. Los diferentes grupos de investigación de cada CCAA participaron en estas tareas en función de los intereses y capacidades operativas y de recursos humanos de cada grupo investigador.

	SUBPROYECTOS	TAREAS	CCAAAs
Coordinación Galicia	1.- Optimización del cultivo de la almeja en criadero	<ul style="list-style-type: none"> - Determinar los criterios de calidad de las puestas - Pruebas de alimentación en cultivos larvarios - Identificación de la flora microbiana asociada a mortalidades presentes en las diferentes fases del cultivo en criadero 	<ul style="list-style-type: none"> CA de Galicia CA de Asturias CA de Andalucía CA de Cataluña CA de Cantabria
	2.- Caracterización genética de bancos naturales y de los stocks de cultivo de la almeja	<ul style="list-style-type: none"> - Identificación de marcadores genéticos en la almeja - Caracterización genética de los bancos naturales - Comparación de la variabilidad genética de los bancos naturales y de la semilla obtenida de los progenitores - Seguimiento de la incidencia de las repoblaciones en el medio natural 	<ul style="list-style-type: none"> CA de Galicia CA de Asturias CA de Andalucía CA de Cataluña CA de Cantabria

2.1.1. SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA FINA EN CRIADERO

El presente subproyecto planteaba la optimización del cultivo de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, abordando diferentes puntos clave como son: la selección de reproductores para conseguir una buena calidad de puesta; la relación de las composiciones bioquímicas y de ácidos grasos de los ovocitos obtenidos en estas puestas y los buenos desarrollos larvarios; la búsqueda de dietas alimenticias que den unos buenos resultados en la producción de semilla y por último, el seguimiento de los cultivos intentando asociar las mortalidades existentes con su microbiota.

Los objetivos que se abordaron tienen una utilidad inmediata; gracias al estudio de los reproductores, de la calidad de los ovocitos y de las puestas, y el control microbiológico de los cultivos, se pueden optimizar las técnicas de producción en criadero y por lo tanto, mejorar los procesos de producción industrial en instalaciones de este tipo. Las tareas planteadas para la consecución de los objetivos fueron las siguientes:

Determinación de los criterios de calidad de las puestas

Para abordar este objetivo se analizaron, en primer lugar, los reproductores que se iban a utilizar para la obtención de gametos. Se partió de progenitores de distintos bancos que se acondicionaron. Este proceso consiste en mantener a los adultos en las instalaciones de cultivo en unas condiciones adecuadas para controlar el desarrollo gonadal y conseguir períodos de madurez diferentes a los que presentan en el medio natural. La finalidad es potenciar la fecundidad de los progenitores, la calidad de los huevos y la viabilidad larvaria (Utting y Millican 1998). El acondicionamiento se realizó manipulando la temperatura y la alimentación para promover el desarrollo gonadal y la gametogénesis.

Gracias a trabajos anteriores (Ojea *et al.*, 2004), se sabe que la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), posee un período de madurez y puesta comprendido entre los meses de mayo y septiembre. Se trata de un período corto de tiempo para que en un criadero se obtengan puestas, por lo que es de gran interés el estudio del acondicionamiento de esta especie y de esta manera, poder ampliar los meses en los que obtener desoves.

Además, se estudió la inducción a la puesta como otro parámetro para evaluar la calidad de los reproductores y de sus puestas. Aunque se pueden obtener puestas de manera espontánea, la inducción a la puesta o “spawning”, es el procedimiento por el cual los bivalvos maduros son estimulados a liberar sus gametos en respuesta al estímulo que se les ha aplicado. La inducción a la puesta en un criadero permite obtener puestas cuando se necesiten, siempre que los individuos presenten gametos maduros. Esto permite planificar los cultivos, además de realizar una fecundación controlada.

Pruebas de alimentación en los cultivos larvarios

Dentro de los factores que pueden influenciar el buen desarrollo de los cultivos destaca la alimentación. La nutrición puede ser el factor dominante en el buen desarrollo larvario de los moluscos bivalvos, influyendo en mayor medida la temperatura y/o la salinidad. A su vez, este factor puede ser la causa de la gran variabilidad que presentan los cultivos larvarios (Marshall *et al.*, 2010).

Debido a su importancia en la producción larvaria, se hicieron pruebas de alimentación con diferentes especies de microalgas y con las mismas especies, pero cultivadas en diferentes sistemas, a lo largo de todo el cultivo larvario. Además, como el valor alimenticio de la comida es determinado mayoritariamente por su composición bioquímica (lípidos, carbohidratos y proteínas), se analizó el perfil bioquímico del alimento suministrado y se relacionó con los resultados obtenidos en los desarrollos, estudiando el comportamiento de las larvas en cuanto a los crecimientos y supervivencias.

Identificación de la flora microbiana asociada a las diferentes fases del cultivo

La tarea consistió, primeramente, en la puesta en marcha y optimización de un criadero de moluscos. Con este control rutinario se hizo la identificación de puntos críticos y la mejora de las condiciones bacteriológicas de los distintos cultivos que se desarrollan en un criadero de moluscos bivalvos: estabulación de reproductores, cultivos larvarios, postlarvarios y de fitoplancton. Con mayor concreción en el caso del cultivo de la almeja fina.

2.1.2. SUBPROYECTO 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BANCOS NATURALES Y DE LOS STOCKS DE CULTIVO DE LA ALMEJA

El objetivo general de este subproyecto consistió en evaluar en la almeja fina *Ruditapes decussatus*, el nivel de variabilidad y diferenciación genética presente en bancos naturales, reproductores procedentes del medio natural mantenidos en cautividad y la semilla producida en criadero. También conocer la dinámica de reproducción de los reproductores en el criadero, mediante análisis de paternidades, con el fin de aportar pautas a seguir en el manejo de la semilla producida y conocer la incidencia de las repoblaciones en el medio natural. Ante la escasez de marcadores genéticos disponibles para los estudios genéticos en *R. decussatus*, el proyecto contempló también la identificación de marcadores microsatélite, caracterizados por mostrar un polimorfismo elevado debido a variaciones en el número de repeticiones, y la utilización de marcadores basados en intrones ya descritos en esta especie.

Los objetivos específicos incluyeron:

Identificación de marcadores genéticos microsatélites

Se planteó la identificación de marcadores genéticos microsatélites en la almeja *Ruditapes decussatus*, cubriendo la escasez de marcadores de ADN necesarios para estudios genéticos en esta especie. Se llevó a cabo siguiendo dos estrategias: (1) probando la utilidad de los cebadores de microsatélites desarrollados recientemente en la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), optimizando las condiciones de amplificación de PCR y (2) construyendo para *R. decussatus* dos genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite. El procedimiento implicaba la extracción y digestión de ADN y la selección de las secuencias microsatélite.

Caracterización de los bancos naturales

Se contemplaba la caracterización de los bancos naturales empleando los marcadores microsatélites (identificados en este proyecto) y polimorfismos de intrones (ya disponibles) para evaluar el nivel de variabilidad genética presente en bancos naturales de las cinco Comunidades Autónomas participantes en este proyecto (Andalucía, Cataluña, Cantabria, Asturias y Galicia).

Comparación de la variabilidad genética de bancos naturales y semilla obtenida en cultivo a partir de progenitores procedentes del medio natural.

Los reproductores utilizados para la obtención de semilla fueron genotipados para los microsátélites y polimorfismos de intrones disponibles. También la semilla procedente de esos reproductores fue genotipada empleando microsátélites. La comparación de los datos de variabilidad genética y riqueza alélica de esta muestra con los de la población parental, permitió obtener estimas indirectas del tamaño efectivo de las poblaciones obtenidas en el criadero, estableciendo relaciones de parentesco entre los individuos producidos en criadero.

Seguimiento de experiencias de repoblación de bancos naturales

Para la implementación de programas de repoblación es aconsejable hacer un seguimiento que permita evaluar el éxito del mismo. Los marcadores de ADN, combinados con métodos estadísticos de análisis de mezclas de poblaciones, pueden utilizarse eficazmente para detectar los individuos procedentes del criadero en la población repoblada, y la aplicación de estas técnicas, permitirá establecer la conveniencia de la repoblación, y en su caso, la metodología más adecuada para su realización. El seguimiento de la repoblación se llevó a cabo en dos poblaciones para las cuales se disponía de estimas de tamaño de censo de bancos naturales y se pudo obtener muestras de semilla natural con tamaños similares a los producidas en criadero y liberadas al medio.

2.2. OBJETIVOS REALIZADOS

Se han abordado todos los objetivos iniciales planteados en el proyecto. Además se amplió en el primer subproyecto, el estudio del preengorde de la semilla de almeja fina.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA FINA EN CRIADERO

2.3.1.1. Línea 1. Determinación de los criterios de calidad de las puestas

2.3.1.1.1. Recogida y mantenimiento de los reproductores

Los reproductores de almeja fina se recogieron de los diferentes bancos naturales en las distintas comunidades, y dentro de cada una de ellas, de diferentes localidades. Esta recogida se realizó en diferentes épocas del año.

Se trasladaban a los criaderos. Las condiciones de este traslado fueron generalmente en seco y frío y el tiempo del traslado es como máximo de 24 h y una vez en el criadero, eran estabulados en diferentes tanques (Figs.1, 2, 3 y 4).

Los reproductores si se recogían cuando ya estaban maduros en el medio natural (mayo-agosto), se mantenían unos días en el criadero hasta obtener la puesta. Los que se recogían en épocas diferentes, se mantenían acondicionados para conseguir su madurez.



Figura 1.- Bandejas de estabulación de reproductores (IRTA - Cataluña)

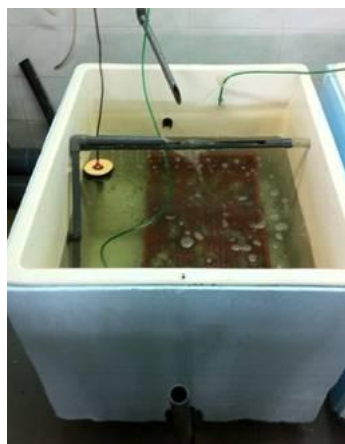


Figura 2.- Tanque de estabulación de reproductores (CEP Castropol - Asturias)



Figura 3.- Tanques de acondicionamiento de reproductores (CIMA - Galicia)



Figura 4.- Tanques de acondicionamiento de reproductores en el (IFAPA-Andalucía)

2.3.1.1.2. Condiciones de Acondicionamiento

Para acondicionar los reproductores se utilizaron tanques de distintos volúmenes (20-200 L) y con diferentes tasas de renovación del agua.

Se alimentaron con una dieta mixta de varias especies microalgales: *Isochrysis galbana* (Ig), su clon T-iso (T-Ig), *Pavlova lutheri* (Pl), *Tetraselmis suecica* (Ts), *Chaetoceros* sp. (Cht), *Phaeodactylum tricornutum* (Pt) y *Skeletonema costatum* (Sk).

También se emplearon diferentes raciones de alimento calculadas en porcentaje de peso seco de microalgas respecto al peso seco de los reproductores. (2-10%).

Al comienzo del acondicionamiento, se procesaba una muestra del lote de reproductores que se han estabulado para tomar los datos biométricos: longitud, altura, grosor, peso fresco total (P.F.T.), peso fresco de la concha (P.F.C.), peso fresco de la vianda (P.F.V), peso fresco de la gónada (P.F.G.), peso seco de la concha (P.S.C.) y peso seco de la gónada (P.S.G.). Con los datos obtenidos, se calcularon los índices de condición necesarios para hacer el seguimiento de la maduración gonadal durante el acondicionamiento.

2.3.1.1.3. Seguimiento del grado de madurez gonadal

Al inicio del acondicionamiento y después mensualmente, se realizaron controles histológicos de las gónadas de entre 10 y 20 individuos. De cada ejemplar diseccionado se separaron la glándula digestiva, la gónada y el resto de la vianda. Una sección de la gónada se introdujo en un cassette para el análisis histológico. Las muestras se fijaron en fijador Davidson durante 24 horas. Se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y se incluyeron en parafina a 60°C. Las preparaciones se han realizado con cortes de 7 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La caracterización descriptiva de las fases del ciclo reproductivo se realizó a partir de la observación al microscopio de las preparaciones histológicas. Se siguió la escala gametogénica descrita por (Wilson y Seed, 1974), con ligeras modificaciones por parte de cada grupo investigador. Esta escala diferencia varios estadios:

Reposo sexual. Sexo indeterminado. No se aprecian folículos gonadales y los tejidos musculares y conectivos ocupan el total del área analizada.

Inicio del desarrollo gametogénico. Aparecen folículos con células germinales adheridas a las paredes. Hay abundancia de células vesiculares y células musculares. El sexo es difícilmente determinable.

Fase de gametogénesis avanzada o desarrollo gametogénico. En la que los folículos ocupan la gran mayoría de la masa visceral. En los folículos machos, aparece una larga banda centrípeta de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas, con algunos espermatozoides libres en el lumen. En los folículos hembras, los ovocitos acumulan vitelo, los ovocitos jóvenes están pegados al contorno folicular, pero ya hay algunos ovocitos maduros libres en el lumen.

Madurez morfológica. El manto está lleno de folículos que ocupan casi toda la superficie de la gónada, recubriendo así el tejido conjuntivo. En los machos, aparecen los folículos con células germinales por la parte externa, los espermatozoides están en todo el folículo en disposición radial. Las hembras presentan ovocitos pedunculados, células jóvenes pegadas a la pared folicular que se van a ir desarrollando y también hay algunos ovocitos libres en el lumen.

Puesta. En los machos los espermatozoides pierden su disposición radial y la densidad de los folículos disminuye. En las hembras los ovocitos toman una forma esférica y la gran mayoría están desprovistos del pedúnculo de sujeción. En esta fase también se pueden observar zonas vacías en las que los gametos ya han sido emitidos.

Puesta reciente o postpuesta. Los folículos se deshacen y degeneran, aparecen restos de gametos y los amebocitos atacan los gametos no puestos. El animal entra en reposo sexual.

En algunos casos, diferenciar entre la etapa de madurez morfológica y la de puesta, es complicado. Por ello, hay seguimientos histológicos en los que ambas fases se han considerado la misma.

Para determinar el grado de maduración gonadal y corroborar lo visto mediante histología, también se calcularon varios índices de condición. Estos índices son cocientes numéricos que, junto con el análisis histológico, nos dan una idea más exacta del proceso de maduración de las almejas. Los índices calculados fueron:

Índice de Condición Total Fresco:

$$\text{ICTF} = \text{Peso fresco vianda} / \text{Peso fresco total}$$

Índice de Condición Fresco:

$$\text{ICF} = \text{Peso fresco vianda} / \text{Peso fresco concha}$$

Índice de Condición Gonadal Fresco:

$$\text{ICGF} = \text{Peso fresco gónada} / \text{Peso fresco concha}$$

Índice de Condición Gonadal Seco:

$$\text{ICGS} = \text{Peso seco gónada} / \text{Peso seco concha}$$

Índice de Condición Somático Fresco:

$$\text{ICSF} = (\text{Peso fresco vianda} - \text{Peso fresco gónada}) / \text{Peso fresco concha}$$

Índice de Condición Somático Seco:

$$\text{ICSS} = (\text{Peso seco vianda} - \text{Peso seco gónada}) / \text{Peso seco concha}$$

2.3.1.1.4. Métodos y análisis bioquímicos

Para el estudio de la composición bioquímica de los reproductores, se analizaron carbohidratos, lípidos totales, proteínas y ácidos grasos al inicio del acondicionamiento y posteriormente, en controles quincenales o mensuales. En la recogida de las muestras, se separaron la gónada de la masa visceral, tanto en machos como en hembras, y así determinar la diferente evolución de los principales componentes bioquímicos en función del tejido y el sexo.

Para determinar los carbohidratos se cuantifica la glucosa total por el método de Dubois (1956) o bien por el método de Dreywood (1946), este último, empleado en tejido de moluscos por Fraga (1956). Para ello se emplea el reactivo Antrona-sulfúrico, siendo el estándar utilizado: D (+) glucosa anhidra (Merk®) en un rango de concentraciones de 15-105 µg para obtener la recta de calibración. Finalmente se midió la absorbancia a 625 nm.

Para la determinación de las proteínas se utilizó el método modificado de Lowry (1951), basado en los resultados de Bensadoun y Weinstein (1976) y Hess *et al.* (1978). La recta de calibración se realiza utilizando como estándar la seroalbúmina bovina (Sigma®) en un rango de concentraciones de 5 a 30 µg. La lectura en el espectrofotómetro se lleva a cabo a una longitud de onda de 750 nm.

Para la extracción de lípidos totales se siguió el método de Folch-Lee (1957) basado en lavados con cloroformo-metanol en proporción 2:1. Una vez obtenido el sobrenadante, se lava con cloruro sódico para eliminar impurezas poniéndolo en una ampolla de decantación, que se mantiene en reposo durante 24 horas. Para pesar los lípidos resultantes de la extracción, en principio, se evaporan con una burbuja de nitrógeno y se redisuelven en cloroformo para posteriormente hacer la pesada de una alícuota por triplicado.

Los ácidos grasos se determinaron a partir de una alícuota de las muestras de lípidos totales almacenadas en cloroformo metanol (2:1, v/v). La separación de las clases lipídicas (Lípidos Neutros y Polares) se realizó siguiendo los métodos de Marty *et al.* (1992) y de Olsen y Henderson (1989). Se utilizaron los métodos de análisis y protocolos de determinación y cuantificación de ácidos grasos de Christie (1982) y de Metcalfe y Schmitz (1961) (modificado por Marty *et al.*, 1992). La transesterificación realizada fue ácida y se llevó a cabo con el reactivo trifluoruro de boro-metanol (15% m/m) y con clorhídrico en metanol y una vez obtenidos los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se extraen y purifican en HPLC o mediante cromatografía en capa fina. Para su análisis se utiliza un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama (FID), inyector tipo “on-column” o “splitless/Split” y una columna capilar (30 m/0,25 mm ID/0,25 Fm. 260°C). Como estándares, para la identificación y cuantificación, se emplearon: mezcla de 37 ácidos grasos metilados, Sigma® 189-19 y como patrón interno, el ácido tricosanoico (C23:0) y el ácido henecosanoico (C21:0).

2.3.1.1.5. Tratamiento estadístico de los resultados

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS® o el programa Statistica. Para comparar el crecimiento, la supervivencia larvaria, la composición bioquímica, tanto de las dietas como de las larvas, así como su perfil en ácidos grasos, se utilizó un ANOVA.

En todas las comparaciones de medias se intentó agrupar los datos en grupos definidos como huevos, larvas D, larvas pediveliger o postlarvas. En los casos en los que no se reunían las condiciones para realizar el ANOVA (bien fuera por el tamaño muestral, o por el incumplimiento por parte de algunos datos de la distribución normal o que no presentaban homogeneidad de varianzas), la comparación se realizó con tests no paramétricos. Para el contraste de más de dos muestras se aplicó el test H de Kruskal-Wallis y para el contraste de dos a

dos se usó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney.

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para el estudio de la normalidad. La homogeneidad de varianzas se ha comprobado mediante el test de Barlett o el de Levene. Las comparaciones múltiples se han llevado a cabo mediante el test de comparación múltiple de rango (test de Tukey).

Se utilizan los siguientes símbolos para referirse al nivel de significación:

$p \geq 0,050$ Diferencias no significativas

$0,010 < p < 0,050$ Diferencias significativas al nivel del 95%

$0,001 < p < 0,010$ Diferencias altamente significativas al nivel del 99%

Para el estudio de la asociación entre parámetros, se utilizaron los coeficientes de correlación de Spearman y de Pearson.

2.3.1.1.6. Inducción a la puesta

La técnica empleada para inducir el desove de los reproductores fue el “choque térmico”. Ésta consiste en someter a las almejas a cambios bruscos de temperatura, los cuales favorecen la liberación de los gametos maduros al medio. El fundamento de la técnica se basa en la diferencia entre la temperatura más baja y la más alta, que normalmente, como mínimo, ha de ser de unos 10°C. Se suele complementar esta técnica añadiendo pequeñas cantidades de microalgas. Los machos suelen desovar antes que las hembras, por lo que la adición de esperma sirve como estímulo para favorecer el desove de las hembras.

Durante la duración de este proyecto, se han ido evaluando diferentes aspectos técnicos de la inducción a la puesta:

Recipientes para realizar la inducción

Se evaluaron distintos tipos de contenedores, desde bandejas de poco volumen y fondo oscuro, hasta tanques de mayor volumen, en los cuales se mantenía a las almejas en bandejas en superficie o en el fondo de los tanques. Cada CCAA se ajustó a las posibilidades de sus instalaciones:

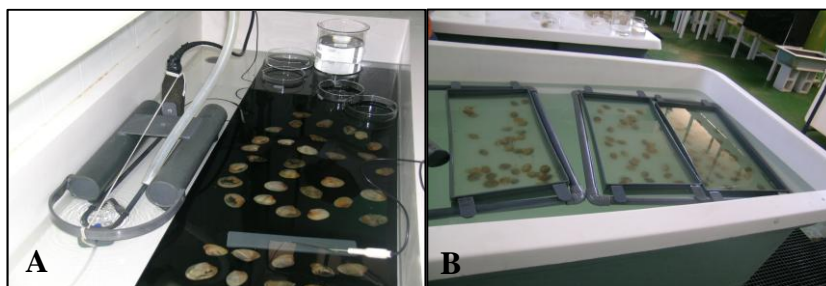


Figura 5.- Sistemas para la inducción a la puesta utilizados en la CCAA de Andalucía. A) En bandeja poco profunda de fibra (200 x 50 x 30 cm), con fondo negro y una profundidad de agua de 15 cm (fregadero). B) En tanque de fibra (1000 L) que se completa con agua y en su superficie se colocan bandejas (100 x 50 cm) con fondo de malla, en las que se sitúan los reproductores (puesta en masa, Manzi y Castagna, 1989)



Figura 6.- Sistemas para la inducción a la puesta utilizados en la CA de Galicia. A) En bandeja poco profunda (10 cm) y fondo oscuro. B) En los mismos tanques de acondicionamiento pero con una profundidad de agua de unos 20 cm.

Métodos de inducción

El protocolo seguido fue someter a las almejas a choques térmicos de agua fría (10-15°C) y agua caliente (24-28°C), en períodos desde 20 minutos hasta hora y media. Se someten las almejas a períodos en seco, previos a la inducción, desde una hora hasta toda la noche. Las temperaturas fueron diferentes, desde mantenerlas a temperatura ambiente 18-20°C, hasta temperaturas bajas en nevera (4-5°C). El número máximo de ciclos (agua fría + agua caliente) fueron de uno a tres.

2.3.1.2. Línea 2. Pruebas de alimentación en los cultivos larvarios

2.3.1.2.1. Condiciones generales y toma de muestras

Los cultivos larvarios comienzan con el cultivo de la larva D que se obtiene después de 48 h de la fertilización del huevo. Se realizaron en tanques de diferente tamaño y forma (descritos detalladamente a continuación), en circuito cerrado. El cambio de agua se realizó tres veces a la semana con agua filtrada y esterilizada por ultravioleta. La temperatura del agua se mantuvo entre 17 y 24°C. La limpieza del tanque se realizaba aprovechando este momento, con agua, jabón y cepillo, una pasada con lejía, y posterior enjuague con agua dulce y salada. Todo el material era desinfectado a base de sumergirlos en baños de lejía (tamices, vasos, etc).

Las muestras de los diferentes estadios embrionarios y larvarios se observaron “*in vivo*” al microscopio óptico. Para estimar el número de larvas que había en cada momento del cultivo larvario, se recogían las larvas que quedaban retenidas en los tamices al vaciar el contenido de los tanques, y se disponían en un vaso de precipitado de volumen conocido. Se homogeneizaron, se tomaron 5 alícuotas que se depositaron en portaobjetos escavados y se procedió al conteo de las mismas bajo lupa. A partir de estas alícuotas se calculó el número total de larvas presentes en el cultivo. Para el seguimiento del crecimiento se midió la longitud y el alto de 50 larvas elegidas aleatoriamente con una lupa acoplada a un analizador de imagen y se contaron para poder calcular la supervivencia. El cálculo de la misma se realizó a partir del número inicial de ovocitos liberados y del número inicial de larvas D.

Durante los años de estudio, se han alternado cultivos larvarios con fines productivos (producción de semilla), empleando la metodología utilizada habitualmente, con cultivos larvarios experimentales, en los cuales se han ensayado diferentes condiciones que pudieran optimizar los rendimientos larvarios.

Entre los factores ambientales que afectan al crecimiento de las larvas, la temperatura, salinidad y alimentación son los que han recibido más atención. En el control de la nutrición, además de la cantidad, se controló la calidad del alimento suministrado.

A continuación se detallan los parámetros y condiciones de cultivo larvario con las que se ha trabajado durante la duración de este proyecto.

Tipos de tanque de cultivo

El desarrollo embrionario de los huevos y el posterior cultivo larvario se realizaron en diferentes tipos de tanques, según las posibilidades técnicas de cada criadero. Además, en alguna ocasión, se realizó alguna prueba en la que se comparó cómo el material y la forma de estos tanques podía influenciar el buen desarrollo de los cultivos larvarios.

A continuación se detallan las características de los diferentes tipos de tanques empleados:

Tabla I.- Tanques de cultivo larvario empleados a lo largo del proyecto.

Forma del tanque	Material	Volumen (L)
Tronco-cónico	Fibra	500
Tronco-cónico	Fibra	150
Tronco-cónico	Fibra	50
Tronco-cónico	Polietileno blanco	2000
Tronco-cónico	Polietileno blanco	350
Cilíndrico de base plana	Polietileno blanco	50



Figura 7.- Tanques troncocónicos (500 L) de fibra de vidrio.



Figura 8.- Tanques troncocónicos (150 L) de fibra de vidrio.



Figura 9.- Tanques troncocónicos (50 L) de fibra de vidrio.



Figura 10.- Tanques troncocónicos (2.000 L) de polietileno blanco.



Figura 11.- Tanques troncocónicos (350 L) de polietileno blanco.



Figura 12.- Tanques cilíndricos con base plana (50 L) de polietileno blanco.

Se realizó una prueba específica para el estudio de los tanques de cultivo larvario. Se compararon los tanques troncocónicos (50 L) de fibra de vidrio (Fig. 9) con los tanques cilíndricos (50 L) de base plana y polietileno blanco (Fig. 12).

Para esta experiencia, se repartieron 1.000.000 larvas en cuatro lotes de 250.000 unidades, dos lotes se colocaron en dos tanques de tipo troncocónico y otros dos en dos tanques cilíndricos de base plana. Tras 25 días de cultivo, las larvas se encontraban preparadas para la fijación y se dio por finalizada la experiencia.

Sistemas de renovación de agua. Circuito cerrado y abierto

Se valoró el efecto de la renovación de agua sobre las larvas comparando cultivos en circuito abierto y cerrado.

El circuito abierto se llevó a cabo en tanques troncocónicos de 150 L (90 L de volumen real de cultivo) colocando en el desagüe del tanque, una red de malla de 30 μm para evitar la pérdida de larvas, y un rebosadero en el exterior, conectado al desagüe, para mantener el volumen del cultivo (Fig. 13). La renovación de agua en estos tanques se realizó mediante dos procedimientos:

Circuito Abierto-Reserva: se añadía una mezcla de agua y fitoplancton de forma continua, con un flujo de renovación diaria constante gracias a una bomba de impulso desde un tanque de reserva, éste se renovaba cada dos días.

Circuito Abierto-Libre: se colocaron los tanques de cultivo de manera que recibían de forma continua agua desde una tubería general, con un flujo de renovación diaria, y se les administraba el fitoplancton independientemente desde un depósito con una bomba de impulso.

Estos tanques se limpiaban y renovaban una sola vez a la semana.

El circuito cerrado se llevó a cabo en los mismos tanques que el circuito abierto pero sin renovación de agua. Estos tanques se limpiaban y se renovaba todo el agua de cultivo tres veces por semana.



Figura 13.- Sistema de cultivo larvario en circuito abierto y circuito cerrado.

La densidad inicial de ambos tipos de cultivos fue de 6 larvas/mL. La temperatura del cultivo se mantuvo entre 22 y 24°C, con una salinidad de 36‰.

La dieta que se suministró a lo largo del ensayo se detalla en siguiente tabla.

Tabla II.- Dieta suministrada durante el cultivo larvario en circuito abierto y cerrado. T-iso (Clon T-iso de *I. galbana*), PI (*Paulova lutheri*), Cc (*Chaetoceros calcitrans*). Los valores de cada especie microalgal se expresan en número de células por μL .

DIETA			
Fecha	Tiso	PI	Cc
	cel/ul		
9 jun -15 jun	50		
16 jun -20 jun	50		21
21-jun	25	25	21
23-jun	32	16	21
25-jun	36,5		10

Para comparar el crecimiento y la supervivencia de las larvas cultivadas en circuito abierto y circuito cerrado, se utilizó un ANOVA usando el paquete estadístico SPSS®.

La temperatura del cultivo se mantuvo entre 22 y 24°C, con una salinidad de 36‰.

Densidad larvaria

Durante los años de estudio, se han mantenido los cultivos larvarios a diferentes densidades iniciales. Debido a la necesidad de ajustar las condiciones de cultivo a las posibilidades de cada criadero, en muchos casos, los cultivos larvarios se iniciaban con un número elevado de larvas. Además, con la intención de aprovechar todas las larvas de las que se disponían, hay datos muy variados de densidades empleadas (desde 4 larvas/mL hasta 14 larvas/mL).

No obstante, y debido a la variedad de resultados obtenidos, se decidió realizar una prueba en la que se evaluó el efecto de la densidad en el rendimiento del cultivo larvario. Se compararon dos cultivos a diferente densidad, uno a 5 larvas/mL (densidad que se considera normal en el cultivo de moluscos bivalvos) y otro a 0,6 larvas/mL (densidad muy baja).

Esta prueba se llevó a cabo en tanques troncocónicos de 400 L de volumen real, a una temperatura de $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$. La alimentación fue constituida por una mezcla de tres especies microalgales (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Tetrasemis suecica*). La ración se ajustó al número de larvas, siendo de 80 cél/ μL en el cultivo a alta densidad y de 30 cél/ μL en el cultivo a baja densidad. La salinidad fue igual para ambos tratamientos, $33 \pm 1\text{‰}$.

Sistemas de fijación

Una vez que las larvas alcanzan la fase pediveliger (aparición del pie) es el momento en el cual afrontan la transición de la fase natátil larvaria a sésil (postlarva). A partir de ese instante, las larvas “caen” al fondo de los tanques (etapa de fijación) y tiene lugar la metamorfosis a postlarvas. Para evitar esto, se colocan en los tanques unas estructuras con fondo de malla que retienen las postlarvas. Existen diferentes sistemas (Figuras 14, 15 y 16).

Cilindro de postlarvas con fondo de malla de 118 μm . El área de superficie del cilindro fue de $0,0314 \text{ m}^2$. Se impulsó el agua al interior del cilindro mediante un flujo ascendente forzado con “air-lift”. Se mantuvieron en tanques de 150 L (Fig. 14).

Bandeja rectangular de postlarvas con fondo de malla de 118 μm . El área de superficie fue de $0,214 \text{ m}^2$. El paso de agua a través de la bandeja se consiguió mediante un flujo descendente forzado con “air-lift”. Se mantuvieron en tanques de 200 L (Fig. 14).

Cilindro de postlarvas con fondo de malla desde 120 μm hasta 500 μm . El área de superficie del cilindro fue de $0,1018 \text{ m}^2$. Se impulsó el agua al interior del cilindro mediante un flujo ascendente forzado con “air lift”. Se emplearon en los tanques de cultivo larvario (Fig. 15) y en los tanques de semilla. Se empieza con una malla de 120 μm , y a medida que crecen las postlarvas, se emplean los mismos cilindros pero con mallas de mayor tamaño.

Bandejas de fondo de malla semi-sumergidas en tanques de 650 litros en régimen semi-cerrado. (Fig. 16). Los tanques son de forma rectangular con sumidero en la

base de forma cónica. Contienen dos calentadores eléctricos de 400 vatios, para mantener la temperatura que se quiera. Tienen un sistema de aireación de air-lift.



Figura 14.- Diferentes sistemas de fijación y cultivo postlarvario.



Figura 15.- Cilindro de postlarva de mayor superficie.

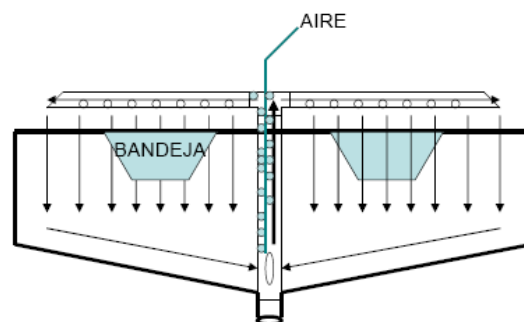


Figura 16.- Tanques con bandejas de fijación de postlarvas.

2.3.1.2.2. Cultivo de fitoplancton

Diferentes sistemas de cultivo

Cultivo en matraz

El cultivo en matraz se realiza normalmente dentro de una cámara isoterma que mantiene la temperatura constante a $19^{\circ}\text{C}\pm 1$. Con luz 24 h/día suministrada por lámparas fluorescentes. Los matraces se esterilizan en autoclave y como nutrientes se usan medios nutritivos que contienen macro y oligoelementos y generalmente vitaminas.

Cultivo en bolsas en cerrado

Este cultivo se realiza en bolsas de plástico de volumen entre 30-40 litros, pueden instalarse dentro del criadero o en invernadero. Es un cultivo cerrado donde se cosecha el cultivo entero.

Cultivo continuo

Es un tipo de cultivo en el cual se está cosechando continuamente una parte del fitoplancton a la vez que se le añade el agua con los nutrientes en la misma proporción. Se puede realizar en bolsas de plástico de volumen 200 o 400 litros. El agua se trata con pasteurizador y la instalación puede estar dentro del criadero con luz artificial o en el invernadero con luz natural y también artificial.

Las siguientes figuras muestran los diferentes sistemas de cultivo de fitoplancton en los criaderos de las diferentes comunidades autónomas participantes en el proyecto.

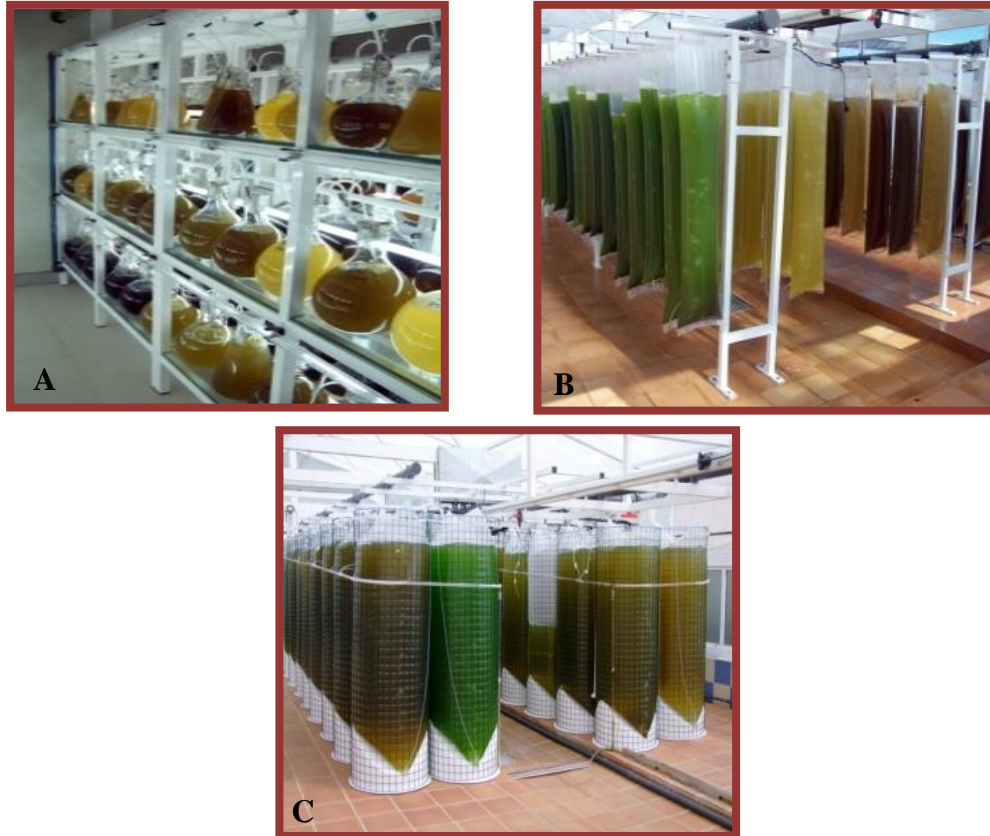


Figura 17.- A: Cultivo de fitoplancton en matraces (2-6-10 L). B: cultivo en cerrado en bolsas pequeñas (30-40 L). C: cultivo en bolsas en sistema continuo (400 L) en el CIMA de Ribadeo.

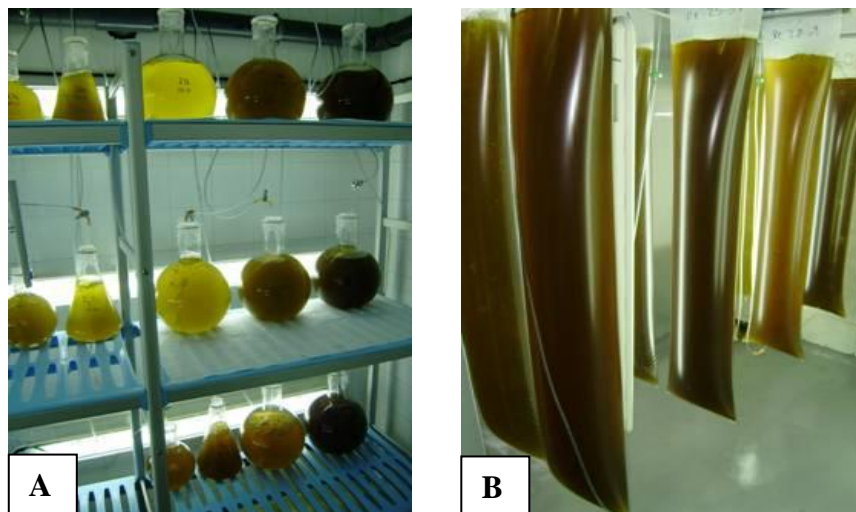


Figura 18.- A: Cultivo de fitoplancton en cámara en matraces de 6 L (pequeña escala). B: cultivo en bolsas de 35 L (gran escala) en el CEP de Asturias.



Figura 19.- Cámara de cultivo isoterma. Fitoplacton en erlenmeyers y matraces en el IRTA, Cataluña.



Figura 20.- Cámara de cultivo en matraces (2-6 L) y bolsas (200 L) en sistema continuo en el IFAPA de Andalucía.

Composición bioquímica del fitoplancton cultivado en matraz

Se ha realizado la toma de muestras en la cámara de cultivo de algas (IFAPA, Andalucía) en distintas épocas del año (verano, otoño, invierno y primavera) y en dos momentos distintos del cultivo (4 y 8 días, con crecimiento exponencial y estacionario del cultivo respectivamente) para la determinación de la composición bioquímica de las microalgas cultivadas en matraz: *T-Iso*, *PI*, *Sk*, *Cc* y *Ts*.

Asimismo, se han tomado tres muestras de las diatomeas (*Sk* y *Chtc*) con tres metodologías de muestreo diferentes, ya que se ha observado la influencia de la metodología sobre los posteriores resultados de las clases lipídicas. Los métodos de muestreo utilizados son:

- 1) las microalgas fueron filtradas y lavadas con formiato amónico al 3% y almacenadas en cloroformo:metanol (2:1) bajo atmósfera de nitrógeno a -20°C.
- 2) inmediatamente después de lavarlas con formiato amónico, se les añade agua hirviendo sobre el filtro antes de almacenarlo en cloroformo:metanol.
- 3) antes de filtrar las algas, éstas se calientan a 60°C, aproximadamente.

De estas muestras de diatomeas se ha elaborado la extracción total de lípidos (según Christie, 1982) y las clases lipídicas (según Olsen y Henderson, 1989).

Composición bioquímica del fitoplancton cultivado en el sistema continuo

En el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA), se instaló un Sistema de Cultivo de Fitoplancton en Continuo como mejor opción para abastecer y cubrir los requerimientos alimenticios de todas las especies cultivadas en la planta. Este sistema garantiza una producción no sólo constante en cuanto a cantidad, sino también, en cuanto a calidad nutritiva.

El cultivo en Continuo consta de 40 bolsas de 400 L, se llegan a cosechar hasta 50L/día/bolsa, está ubicado en un invernadero y, los parámetros que le afectan y que hubo que estandarizar fueron: nutrientes (incorporación de distintos tipos de vitaminas), pH (con aporte de CO₂), y luz (fotoperíodo). Las especies cultivadas y objeto de estudio fueron: *Tetraselmis suecica* (*Ts*); *Pavlova lutheri* (*PI*); *Isochrysis galbana*/*T-Iso* (*T-Iso*) y *Chaetoceros muelleri* (*Chatm*).

Para el estudio de la composición bioquímica se recogieron muestras de cada especie en su fase exponencial del cultivo, previo conteo del número de células, en filtros Whatman almacenándose hasta analizar, según los métodos descritos, en el apartado de bioquímica.

2.3.1.2.3. Pruebas de alimentación en los cultivos larvarios

Con el objetivo de determinar la combinación de especies microalgales que suponen un mejor rendimiento del cultivo larvario, las raciones óptimas para un buen desarrollo larvario, y el sistema de cultivo de fitoplancton que proporciona

mejor calidad de microalgas, se han llevado cabo diferentes pruebas de alimentación.

Comparación de diferentes sistemas de cultivo de fitoplancton

Se realizaron varias pruebas en las que se alimentaron, larvas de *Ruditapes decussatus*, con mezclas de las mismas especies microalgales cultivadas en diferentes sistemas de producción.

Se comparó el fitoplancton cultivado a pequeña escala, en matraces de 2 y 6 L, con el que se cultivó a mediana escala, en bolsas de 35 L, y con el que se obtenía en un sistema de producción continua a gran escala, en bolsas de 400 L.

En todos los casos, se alimentó a las larvas con una mezcla de las siguientes especies microalgales: *Isochrysis galbana*, su clon T-iso, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*. La ración diaria fue de 40 equivalentes y se suministró una vez al día.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas que se citaron en el apartado anterior, con una salvedad, la densidad. Estas pruebas de alimentación se realizaron en cultivos larvarios con diferentes densidades comprendidas entre 5 y 9,5 larvas/mL.

Comparación de cuatro dietas diferentes

Se compararon cuatro dietas diferentes, todas ellas de especies cultivadas en la cámara isoterma (matraces de 6 L):

Dieta 1: $Ig(1) + Mn(1) + Cht(1)$

Dieta 2: $Ig(1) + Mn(1) + Cht(2)$

Dieta 3: $Ig(1) + Mn(1)$

Dieta 4: Cht

Esta prueba se realizó con un desove inducido de 53.440.000 huevos. Tras una transformación a larva D del 24%, se seleccionaron 12.000.000 de larvas, que quedaban retenidas en tamiz de 60 μ m, y que fueron las que utilizamos en la prueba de alimentación.

Estas larvas se repartieron en 8 tanques de 150 L, a razón de 1.500.000 larvas/tanque ($p=10$ lv/mL). Dos réplicas por dieta. Las larvas fueron alimentadas diariamente, usando la misma ración inicial en todas las dietas, 40 células equivalentes/ μ L/día.

Esta prueba se mantuvo durante 22 días, momento en el cual, todas las larvas estaban en la fase de pediveliger. Durante el desarrollo larvario se recogieron muestras para estimar el crecimiento y la supervivencia.

La composición bioquímica de las larvas pediveliger, así como de las cuatro dietas, fue analizada mediante los métodos bioquímicos descritos anteriormente.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS®. Para comparar el crecimiento, la supervivencia y la composición bioquímica, tanto de las larvas como de las dietas, se utilizó un ANOVA. En los casos en los que no se reunían las condiciones para realizar el ANOVA, se utilizaron métodos no paramétricos como los tests de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney.

Efecto del ayuno en los primeros días del cultivo larvario

Con el fin de determinar cómo es el consumo de reservas energéticas durante los primeros días del desarrollo larvario de la almeja fina y evaluar las necesidades nutricionales que se han de aportar de forma exógena, es decir, mediante las dietas, se realizó una prueba de ayuno. Se evaluó el efecto que ejerce el ayuno en los primeros días del desarrollo larvario. Se compararon cuatro estrategias de alimentación:

- Grupo control: comió desde el primer día
- Grupo ayuno 2 días: comieron a partir del día 3
- Grupo ayuno 4 días: comieron a partir del día 5
- Grupo ayuno 6 días: comieron a partir del día 7

Esta prueba se realizó con un desove inducido de 46.500.000 huevos. Tras una transformación a larva D del 60%, se seleccionaron 15.000.000 de larvas, que quedaban retenidas en tamiz de 60 μ m, para iniciar la prueba.

Estas larvas se repartieron en 10 tanques de 150 L, a razón de 1.500.000 larvas/tanque ($\rho=10$ lv/mL). Tres réplicas por grupo, excepto para el grupo control que fueron seis réplicas. Las larvas “control” fueron alimentadas diariamente a razón de 40 células equivalentes/ μ L/día. El resto de los grupos ensayados se mantuvieron durante los primeros 2, 4 o 6 días en ayuno, y transcurrido este tiempo, se alimentaron con la misma dieta y ración que el grupo control. Esta prueba se mantuvo durante 27 días, momento en el cual las larvas que habían sobrevivido se pusieron a fijar. Durante el desarrollo larvario se recogieron muestras para estimar el crecimiento y la supervivencia.

Para analizar la composición bioquímica de las larvas de cada grupo, se recogieron muestras al inicio de la experiencia (larva D), a los dos días, a los cuatro, a los seis y, por último, a los 15 días, y así evaluar el perfil bioquímico de cada grupo de ayuno, así como, el de todos los grupos una vez que ya llevaban mínimo una semana alimentándose.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS®. Para comparar el crecimiento, la supervivencia y la composición bioquímica, se utilizó un ANOVA. En los casos en los que no se reunían las condiciones para realizar el ANOVA, se utilizaron métodos no paramétricos como los tests de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney.

Comparación de diferentes dietas a partir de la segunda semana de cultivo

La alimentación proporcionada durante el cultivo larvario estaba compuesta de una mezcla microalgal de matraz (cámara isoterma). El agua de los matraces era autoclavada, siendo previamente rellenados con agua procedente de una línea con batería de filtración: filtro arena, skimmer, carbón activo y filtros de cartucho hasta 1µm.

Se determinaba, tras observación al microscopio, y evolución del cultivo, si se necesitaba incrementar o disminuir la dosis. Para evitar deficiencias en la alimentación, se realizaron puntualmente controles de la densidad de microalgas en el tanque (contaje Coulter Counter), después de añadirlas y al día siguiente. En todos los casos la alimentación fue:

1ª semana: 100% T-ISO, a una densidad de 100.000 cels/ml.

A partir de la segunda semana se compararon dos dietas diferentes:

2ª semana: (o a partir de 120 µm de talla): 50% *Isochrysis galbana* T-ISO, 20% *Tetraselmis suecica*, 15% *Chaetoceros gracilis* y 15% *Phaeodactylum tricornutum* (porcentajes referidos a 100.000 cels/ml equivalentes T-ISO).

2ª semana: (o a partir de 120 µm de talla): 50% *Isochrysis galbana* T-ISO, 50% *Chaetoceros gracilis* (porcentajes referidos a 100.000 cels/ml equivalentes T-ISO).

Se estudió también el perfil bioquímico y de ácidos grasos de las especies microalgales empleadas.

Estudio de la tasa de ingestión en función de la concentración del alimento suministrado

Se seleccionaron 1.200.000 larvas D para realizar la experiencia. Se comparó la tasa de ingestión en función de la concentración de alimento suministrado. Para ello se diseñó una experiencia, por duplicado, con tres concentraciones: baja, media y alta a razón de 20, 40 y 60 cel/µL la primera semana y 40, 60 y 80 cel/µL respectivamente, las tres siguientes.

El cultivo larvario se realizó en tanques cilíndricos de polietileno blanco y con fondo plano de 50 L. Las larvas se mantuvieron a razón de 4 larvas/mL en agua filtrada y esterilizada en circuito cerrado. El cambio de agua se realizó tres días por semana. La temperatura del cultivo fue de 21,5 ±0,5°C y la salinidad de 33±1 ‰. La alimentación fue constituida por una mezcla de *I. galbana*, *T. suecica* y *C. gracilis*.

2.3.1.2.4. Composición bioquímica de las larvas

Durante los cultivos larvarios se han recogido muestras de larvas para su análisis bioquímico. Para la determinación de lípidos totales, carbohidratos y proteínas, las larvas se lavaron con formiato amonio al 3% y centrifugadas. Después se retiraba el sobrenadante y se congelaban. Para el análisis de ácidos grasos, las larvas se recogían sobre filtros Whatman que se lavaban con formiato amonio al 3% y que se depositaban en tubos con 6 mL de Cloroformo-Metanol (2:1). Se burbujeaban con N₂ y se almacenaban en el congelador.

Los métodos empleados para el análisis del perfil bioquímico y de ácidos grasos de las larvas son los mismos que se detallaron al hablar del estudio bioquímico de los reproductores.

2.3.1.3. Línea 3. Identificación de la microbiota asociada a mortalidades presentes en las diferentes fases del cultivo en criadero

La tarea consistió, primeramente, en la puesta en marcha y optimización de técnicas de seguimiento microbiológico en los diferentes sistemas del criadero implicados en el cultivo de las almejas, más concretamente de la almeja fina *Ruditapes decussatus*. Este control rutinario ayudó a la identificación de puntos críticos (circuitos de agua y cultivo de fitoplancton) que intervienen directamente en el cultivo de esta especie en criadero.

Además de este seguimiento rutinario, se llevaron a cabo pruebas encaminadas a mejorar las condiciones bacteriológicas de los distintos cultivos que se engloban en un criadero de moluscos bivalvos; estabulación de reproductores, cultivos larvarios, postlarvarios y de fitoplancton.

2.3.1.3.1. Recogida de muestras

Control del agua

Se toma la muestra con recipientes estériles en diferentes puntos, que recogen los resultados finales de todos los tratamientos de agua usados en un criadero y en los distintos tramos de tubería que llevan el agua a las diferentes secciones: estabulación de reproductores, mantenimiento de semilla, cultivo larvario y cultivo de fitoplancton.

Los sistemas empleados para tratar el agua cruda son básicamente filtración y esterilización. Para filtrar el agua se emplean filtros de arena y de cartucho. Para esterilizar se hace pasar el agua por una lámpara de luz ultravioleta y el agua de los matraces para cultivo de fitoplancton, además se esteriliza en autoclave. Cada criadero emplea el tratamiento que necesite en las diferentes secciones dependiendo de la calidad del agua cruda en las diferentes ubicaciones de los criaderos. Las particularidades de cada uno se especifican en las memorias presentadas por cada comunidad y adjuntadas como anexos en el punto tres de este informe.

Generalmente para los reproductores se emplea sólo el filtro de arena, para semilla y fitoplancton se suele emplear filtros de arena y cartucho y para el cultivo larvario se suelen emplear los tres tipos de filtración.

Los criaderos donde trabajen con un sistema de cultivo de fitoplancton en continuo, disponen además de un pasteurizador para tratar el agua.

Control del fitoplancton

Se recogen las muestras en cada uno de los sistemas empleados para su cultivo, las muestras generalmente se recogen de la mezcla de varias especies de

fitoplancton que se usa para la alimentación de reproductores, larvas y semilla. En determinados casos se pueden recoger muestras de cada especie por separado.

Los sistemas de producción de fitoplancton empleados en los diferentes criaderos que participaron en el proyecto, se pueden resumir en los siguientes:

Cultivo en matraces en cámara isoterma, los volúmenes que se manejan son generalmente matraces de 2, 6 y 10 litros.

Cultivo en bolsas de plástico de 30-40 litros en sistema cerrado.

Cultivo continuo de fitoplancton en bolsas entre 200-400 litros.

Control de reproductores

El control de la carga bacteriana de los reproductores se realiza de forma rutinaria a su llegada al criadero para tener información sobre su estado inicial. Si los reproductores se mantienen en el criadero para ser acondicionados se hacen también controles mensuales y así, poder ver si disminuye o aumenta su carga bacteriana durante el acondicionamiento, y cómo esta carga puede afectar a la viabilidad de sus puestas.

Para la toma de muestras, se usan entre 5 y 10 reproductores y se toma una porción de gónada cortada asépticamente (entre 0,05-0,1g), se tritura y homogeneiza en 1 ml de agua de mar estéril y se realizan las diluciones necesarias.

En algunos casos se toma también una muestra de las paredes de los tanques donde se estabulan los reproductores, para ello se pasa un hisopo estéril por un área de 1 cm², tanto de la pared como del fondo del tanque. Este hisopo se extiende directamente en las placas con los medios de cultivo, para poder aislar los tipos de colonias y tener así un análisis cualitativo.

Cultivos larvarios

Para el control microbiológico de los cultivos larvarios se pueden recoger tres tipos de muestras:

Larvas directas: que se recogen con un asa de siembra de 1 µl directamente después de pasar las larvas del tanque de cultivo a un tamiz. El asa de siembra se extiende a continuación en las placas con los medios de cultivo. Todo el proceso se hace en condiciones estériles usando la llama de un mechero.

Agua del tanque de cultivo: se recoge la muestra con un recipiente estéril y la muestra incluye además del agua, las larvas y el fitoplancton que halla en el tanque.

Muestra de las paredes del tanque recogida con un hisopo estéril, de igual forma que en los tanques de los reproductores.

Las muestras se recogen semanalmente coincidiendo con el cambio de agua de los tanques de cultivo. El agua de los cultivos se recoge del tanque antes del vaciado.

2.3.1.3.2. Realización de siembras en placa

Para la siembra de muestras se utilizan los medios Agar Marino (AM) para recuento de bacterias heterótrofas marinas y Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS), medio selectivo para vibrios.

Siembras de medios líquidos (agua y fitoplancton)

Se preparan en una campana de flujo, diluciones de las muestras recogidas en tubos de cristal estériles a los que se añaden 4,5 ml de agua de mar estéril. De la muestra directa que llamamos -1, se cogen 500 µl y se añaden al primer tubo, que sería la primera dilución (-2), de ésta se cogen otros 500 µl y se añaden al segundo tubo, sería la dilución -3 y así sucesivamente hasta llegar a la dilución necesaria. Una vez hechas todas las diluciones, se coge de cada tubo 100 µl y se siembran a la llama en las placas extendiéndolo bien con un asa.

Para las muestras del agua se suelen sembrar la muestra directa en TCBS y la directa y la primera dilución en Agar marino.

Para las muestras de fitoplancton se siembra la muestra directa en TCBS y la dilución (-4 y -5) en Agar marino.

Para las muestras del agua de los cultivos larvarios, se siembran en TCBS la muestra directa y la primera dilución y la (-3 y -4) en Agar marino.

Incubación y recuento de placas

Las placas una vez sembradas, se incuban a 25°C. El medio TCBS se lee en 24-48 horas, para evitar los problemas de reversión de color de las colonias, que dificultan su interpretación. El AM se deja hasta 7 días para permitir el crecimiento de los tipos más lentos, como pueden ser algunas bacterias pigmentadas. En el caso de muestras cuantitativas, se recuentan aquellas placas con crecimiento entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia (ufc) por placa (Fig. 21).

En algunos casos, se preparan aislados en placas de Agar Marino de colonias diferentes que hayan crecido tanto en TCBS como en Agar Marino.

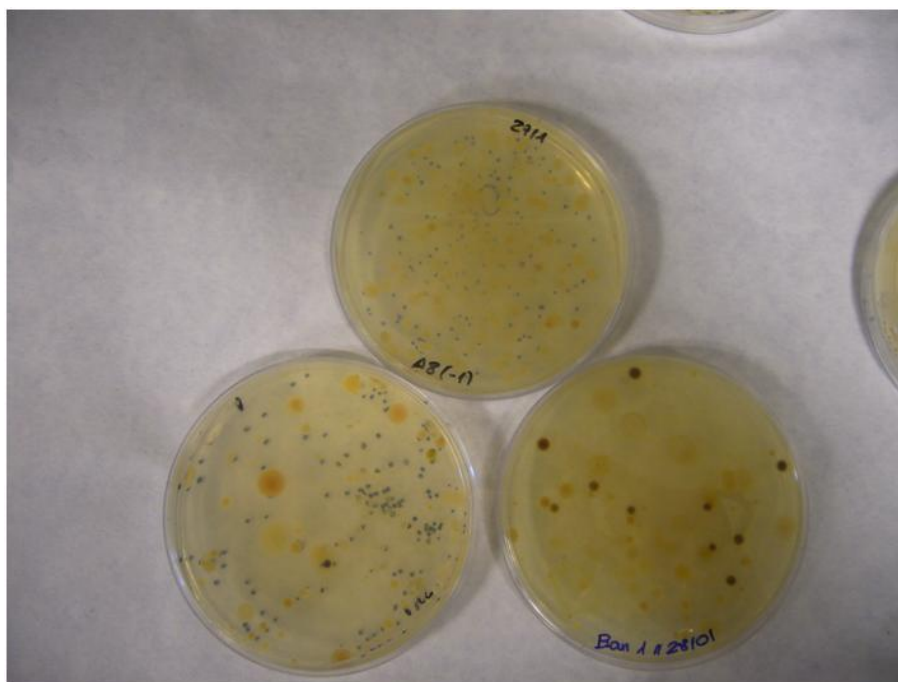


Figura 21.- Recuento de UFC en placas de agar marino (AM).

2.3.1.3.3. Pruebas de depuración de reproductores

Prueba de depuración durante el acondicionamiento

En respuesta a episodios de mortalidades masivas en los cultivos larvarios, en la mayoría de los casos estudiados, provocados por bacterias patógenas oportunistas del género *Vibrio*, se decidió realizar una prueba en la cual se estudió el efecto que diferentes regímenes de temperatura y alimentación ejercen en la depuración de los reproductores durante el acondicionamiento.

Como ya se ha demostrado, los progenitores son una de las vías de entrada de vibrios, mediante transmisión vertical, en los cultivos larvarios (Riquelme *et al.*, 1994, Sáinz-Hernández y Maeda-Martínez, 2005). Por todo ello, es necesario evaluar el estado microbiológico de los individuos utilizados como reproductores, así como buscar la forma de reducir las poblaciones de vibrios asociadas.

Se utilizaron reproductores de almeja fina procedentes de la Illa de Arousa (Galicia), que fueron estabulados, en el mes de mayo, en tanques de 150 L a una densidad de 70 almejas/tanque (1,3 kg/150 L). La renovación del agua fue continua y a una tasa de 20 L/h/kg. Se evaluaron cuatro regímenes diferentes de acondicionamiento, por duplicado y durante 2 semanas: 1: incremento gradual de T^a ($\approx 0.3^{\circ}\text{C}/\text{día}$) y sin alimento; 2: incremento gradual de T^a y con alimento; 3: T^a constante (20°C) y sin alimento; y 4: T^a constante (20°C) y con alimento. La dieta de las almejas que fueron alimentadas se componía de una mezcla de *Isochrysis galbana*, *I. galbana* T-iso, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema costatum* al 6% en peso seco.

Prueba de depuración antes de la inducción a la puesta

Para el seguimiento bacteriológico de los reproductores se tomaron 5 almejas del tanque de acondicionamiento con agua filtrada por 500 μm y con alimento y otras 5 almejas después de 48 h de depuración con agua filtrada por 1 μm y esterilizada con U.V.

El protocolo seguido fue extraer 1g de gónada de cada una de las almejas, homogeneizado en 1mL de agua de mar estéril envejecida. Se realizaron diluciones sucesivas 1:10 (0,5m L de la muestra en 4,5 mL de agua de mar estéril envejecida), para poder realizar el recuento de colonias. La siembra se realizó con 100 μL de la muestra con la dilución adecuada y en placa con los medios AM y TCBS, por extensión con asa de Drigalski e incubación a 25°C.

2.3.1.3.4. Uso de antibiótico en los cultivos larvarios antes de la metamorfosis

Se realizaron varios controles bacteriológicos de diferentes cultivos larvarios, evaluando el uso de antibióticos y su efecto sobre la supervivencia larvaria.

Las condiciones de los cultivos larvarios fueron las mismas que se indican en la línea 2 de trabajo. La única diferencia fue que en los lotes con antibiótico (Cloranfenicol) se añadía, tres veces por semana y coincidiendo con los días de cambio de agua, 2,4 mg/l del mismo.

Las muestras para microbiología de larvas y agua de cultivo se tomaron coincidiendo con el cambio de agua de los tanques y se procesaron según lo descrito anteriormente. Se emplearon los medios AM y TCBS. Se aislaron los tipos de colonia predominantes y se les realizó una caracterización microbiológica básica. Además, se realizaron pruebas complementarias a una selección de aislados del medio TCBS, presuntos vibrios, tanto fenotípicas como de secuenciación del gen ARNr 16S.

2.3.1.3.5. Estudios preliminares del uso de antibiótico en el cultivo de almeja japonesa en criadero

Se realizaron pruebas con diferentes protocolos de tratamiento durante la metamorfosis para comprobar la respuesta de la calidad microbiológica del cultivo de larvas de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*).

Prueba 1

En la primera prueba se comprobó el resultado, del tratamiento del agua con distintos antibióticos, en la microbiología del cultivo y la supervivencia durante la metamorfosis. El uso de antibiótico fue controlado por el veterinario del equipo investigador.

En el día 20 de su desarrollo, una población de larvas de almeja fue distribuida aleatoriamente en cuatro tanques y cada tanque asignado a uno de los dos tratamientos.

Tratamiento A+E: consistió en la dosificación en cada cambio de agua de una combinación de Ampicilina y Estreptomicina a razón de 5 g por cada antibiótico.

Tratamiento Flr: consistió en la dosificación del agua de los tanques con 6 g de Nuflor que contiene Florfenicol.

El resto de parámetros de cultivo, alimentación, renovación discontinua de agua, iluminación, temperatura etc., se mantuvieron iguales para todos los tanques. Cada día se tomaron muestras de agua y se sembraron en el medio agar marino, AM y en TCBS. La experiencia finalizó el día 30 de cultivo.

Prueba 2

En la segunda prueba se comprobó el uso de antibiótico a lo largo del cultivo larvario y postlarvario, más allá de la metamorfosis.

Larvario

La primera parte consta de tres grupos con tratamiento distinto, cada uno de ellos constituido por dos réplicas (seis tanques en total). El primer grupo está formado por los tanques T01 y el T02, que se tratan inicialmente con 10 ppm ml de Oxitetraciclina (OTC). El segundo grupo está formado por los tanques T03 y el T04, que se tratan con 15 ppm de Nuflor. El tercer grupo está formado por los tanques T05 y el T06, que se tratan con 15 ppm de Nuflor.

De manera esquemática, el tratamiento y disposición de los tanques fue el siguiente:

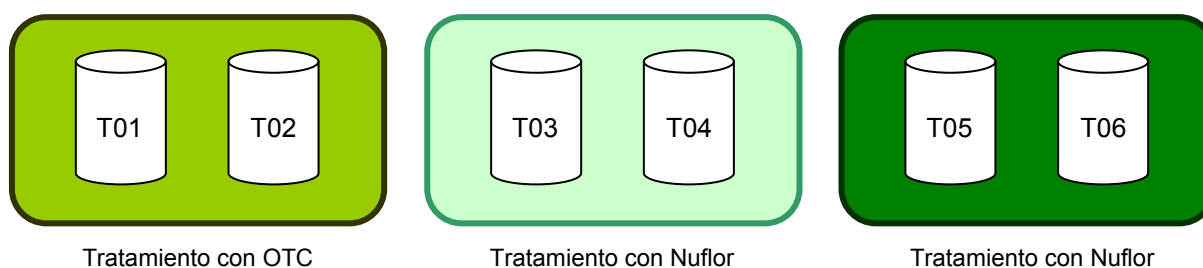


Figura 22.- Distribución de tanques y tratamientos de la primera parte de la prueba.

Metamorfosis

La segunda parte de la prueba, metamorfosis, comienza cuando las larvas de la primera parte alcanzan la talla suficiente para pasar a la zona de postlarvas. No todas las larvas presentan el mismo ritmo de desarrollo, de esta manera, existen diferencias intragrupales que exigen separar la población muestral. En este momento de la prueba tenemos tres tanques: TRA, TRB y TRC, que a su vez, están subdivididos en dos grupos según el estado de desarrollo de las larvas, que son cabezas (larvas con una velocidad de desarrollo mayor que hace que sean más grandes y más avanzadas que las otras) y colas (larvas con menor velocidad de desarrollo). En la figura 23 se muestra la distribución de los tanques. El TRA y el TRB, serán los tanques donde están ubicadas las cabezas (en el TRA, las que proceden de los tanques tratados con OTC y en TRB, las que proceden de los tanques tratados con Nuflor) y el TRC es el tanque donde encontramos las colas. Estos tres tanques se tratan inicialmente con 10 ppm de Nuflor (por motivos referentes al desarrollo de la prueba se disminuye la cantidad) y se les administra diariamente treinta y cinco o cuarenta y cinco segundos de fitoplancton, según los requerimientos de los individuos.



Fig. 23.- Distribución de los tanques de la segunda parte de la prueba.

2.3.2. SUBPROYECTO 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BANCOS NATURALES Y DE LOS STOCKS DE CULTIVO DE LA ALMEJA

2.3.2.1. Muestras analizadas

Se analizaron muestras de almejas de bancos naturales de cada una de las comunidades autónomas participantes, lotes de reproductores procedentes de bancos naturales de Asturias y Galicia y muestras de la semilla producida en criadero a partir de los reproductores capturados en el medio natural. Además, se analizaron dos muestras adicionales de un banco de Galicia: una constituida por almejas de talla similar a la semilla sembrada y otra recogida en el área repoblada diez meses después de la siembra. La tabla III recopila el total de muestras recogidas por los grupos de investigación involucrados en el desarrollo del proyecto. Cada almeja fue diseccionada y los tejidos (branquia, manto, pie y músculo aductor) conservados en etanol hasta su utilización.

*Tabla III.- Muestras de almeja fina recogidas en el transcurso del proyecto. En negrita: muestras de almejas de tamaño aleatorio; *Semilla recogida con un mes de diferencia.*

Localidad	Nº de individuos
Cantabria	
Carasa	60
Pontejos	60
Asturias	
Villaviciosa	55
Reproductores	19
Semilla-Ma	96
Ría Eo	55
Reproductores	45
Semilla-Ma*	96
Semilla-Ju*	96
Semilla mezcla (Eo+Villaviciosa)	96
Galicia	
Cambados	120
Reproductores 1	40
Semilla reproductores 1	155
Reproductores 2	49
Semilla reproductores 2	128
Muestra con tallas similares a las de la semilla (17-38 mm)	166
Muestra después de repoblación (talla superior a la de semilla)	264
Redondela	80
Andalucía	
Isla Cristina	50
Río Piedras	70
Cataluña	
Delta del Ebro	70

Las muestras recogidas en el transcurso del proyecto se complementaron en algunos análisis con otras siete analizadas en un estudio previo por Cordero *et al.* (2012). La Fig.24 indica la localización geográfica de las localidades muestreadas.

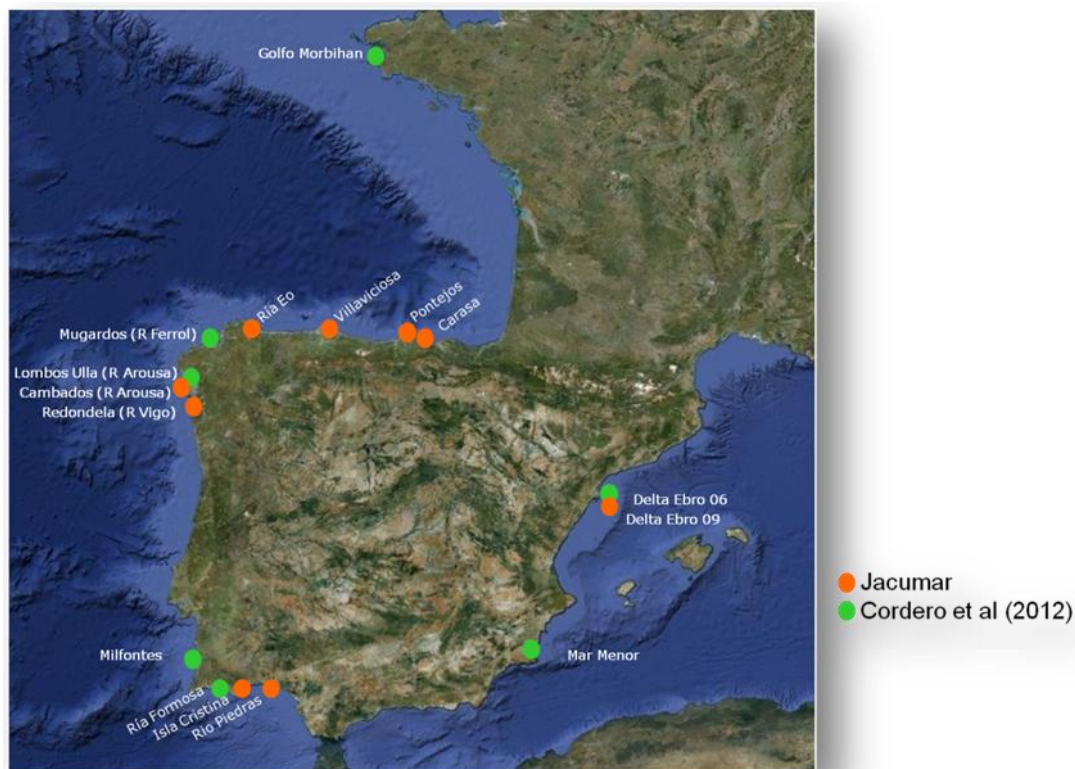


Figura 24.- Localización geográfica de las localidades analizadas. Rojo: muestras obtenidas para el presente proyecto Jacumar. Verde: muestras del estudio de Cordero *et al.* (2012).

2.3.2.2. Extracción de ADN

El ADN se extrajo del pie o músculo aductor utilizando indistintamente un método desarrollado por Fernández-Tajes y Méndez (2007), uno basado en incubación con 5% Chelex 100 a 95°C durante 10 min o dos kits comerciales de extracción (Zymobeads® y dNeasy Qiagen®). Estos métodos se adoptaron después de realizar pruebas con otros protocolos.

2.3.2.3. Desarrollo de marcadores microsatélite

Se siguieron dos estrategias: una basada en el análisis de loci microsatélite heterólogos y otra basada en la construcción de genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite.

Análisis de loci microsatélite heterólogos

Se probaron 9 loci descritos en la especie *Ruditapes philippinarum* por Yasuda *et al.* (2007). Inicialmente se utilizaron las condiciones descritas por los autores tanto en *R. philippinarum* como en *R. decussatus*. Después, para adecuar las condiciones de amplificación en la nueva especie se modificó la concentración de componentes de la reacción (Tabla IV), la temperatura de hibridación de los cebadores y el número de ciclos.

Tabla IV.- Condiciones ensayadas para la amplificación de loci microsatélite heterólogos.

	A	B	C	D
[MgCl ₂](mM)	2	2	1,5	1,5
[Primer](μ M)	0,25	0,5	0,25	0,5
[Taq](U)	0,5	1	1	0,5

Construcción de genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite

Se construyeron dos genotecas, una enriquecida en el trinucleótido ATC, por tratarse de un motivo microsatélite aislado con éxito en otros bivalvos, y otra en el tetranucleótido CTGT, por mostrar este motivo una mayor abundancia relativa respecto a otros motivos tetranucleotídicos (CGAT y GATA) en un análisis Dot-Blot. El método seguido fue el desarrollado por Billote *et al.* (1999) con algunas modificaciones (Fig. 25). El procedimiento conlleva la digestión del ADN con la enzima de restricción *Rsal*, unión de adaptadores específicos de *Rsal* a los fragmentos obtenidos, amplificación por PCR usando uno de los adaptadores como cebador, selección de las secuencias microsatélites mediante hibridación con una sonda microsatélite marcada en el extremo 5' con biotina, y captura de las secuencias hibridadas mediante partículas magnéticas cubiertas de estreptavidina. Tras una amplificación por PCR con uno de los adaptadores como cebador, se procede a la clonación de los productos obtenidos. La genoteca obtenida se somete a hibridación para verificar la existencia de clones con secuencias microsatélite.

Se secuenciaron los clones recombinantes y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Tandem Repeats Finder (Benson, 1999) para identificar y caracterizar las repeticiones microsatélite. Las secuencias se sometieron también a un análisis BLAST con el programa BioEdit (Hall, 1999) para descartar los clones repetidos. Mediante el programa MicroFamily (Megléc *et al.*, 2007) se inspeccionó la presencia de tramos de secuencia con similitud entre clones. Las secuencias únicas con motivos microsatélite se sometieron a una nueva selección con el fin de diseñar cebadores para su amplificación por PCR y verificar su polimorfismo en geles de agarosa. El producto de PCR de los

loci polimórficos se separó en un secuenciador automático y se analizó con el programa GeneMapper v. 3.7 (Applied Biosystems).

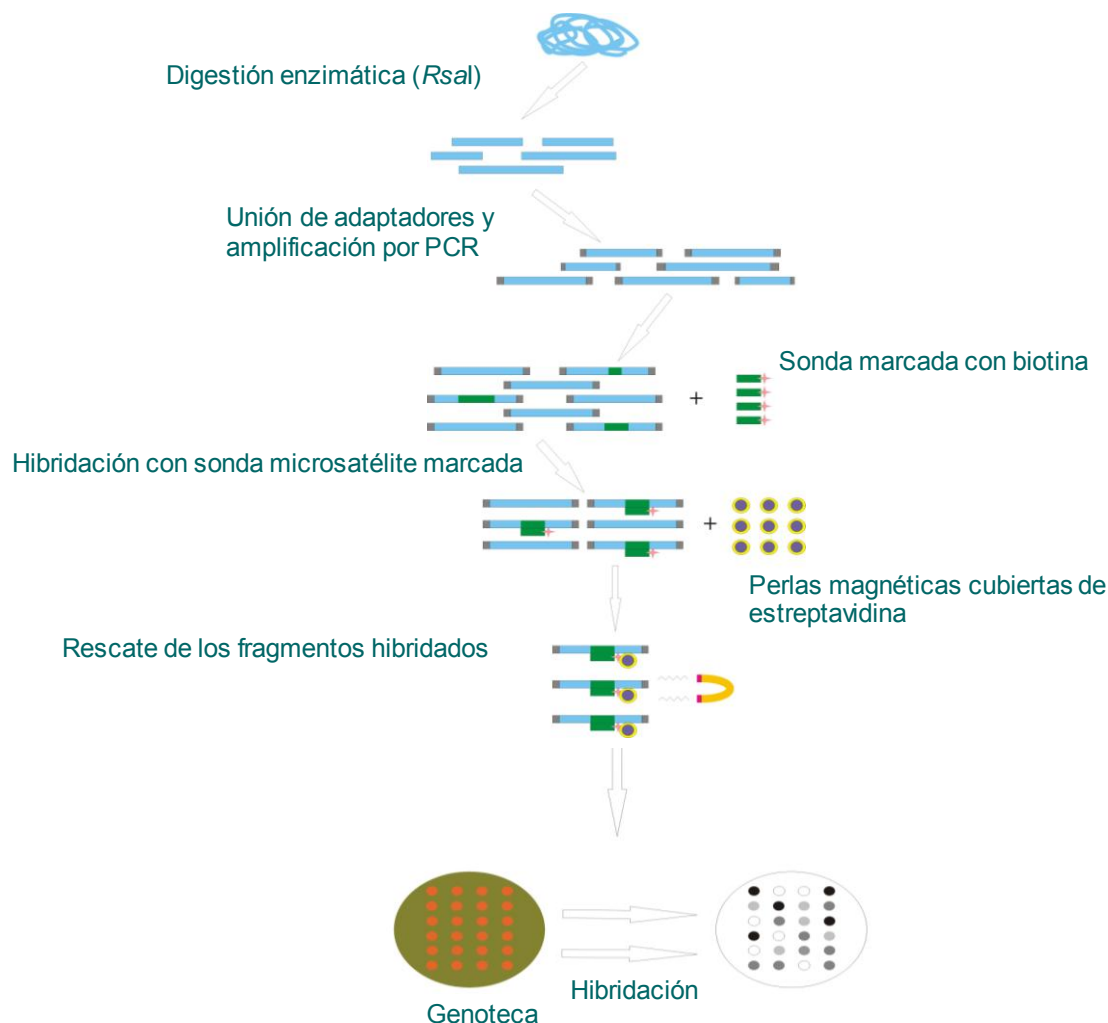


Figura 25.- Esquema representativo del método seguido para la construcción de genotecas enriquecidas en motivos microsatélite.

2.3.2.4. Diseño de PCR múltiplex

Se optimizaron PCR múltiplex que permitiesen analizar en un solo proceso de PCR distintos loci microsatélite. Esta estrategia de análisis reduce considerablemente tanto el coste económico como el tiempo invertido. Mediante el software Múltiplex Manager 1.0 (Holleley y Geerts, 2009), se procedió a combinar los marcadores en el menor número posible de reacciones de PCR múltiplex teniendo en cuenta las temperaturas de hibridación de los cebadores de cada locus y el tamaño en pares de bases de los alelos. Se trató de maximizar la distancia entre marcadores para evitar, en la medida de lo posible, que al analizar nuevas muestras se detectasen en un locus concreto alelos, no detectados previamente, que solapasen en tamaño con otros de los marcadores utilizados con el mismo fluorocromo. Para la amplificación, se utilizó el kit QUIAGEN®

Multiplex PCR y cebadores marcados con distintos fluorocromos (VIC, NED, FAM y PET).

2.3.2.5. Análisis de datos de microsátélites

Análisis de la variabilidad y diferenciación genética

Se calcularon las frecuencias alélicas, el número de alelos por locus, las heterozigosidades observadas y esperadas y los valores del estadístico F_{IS} (Weir y Cockerham, 1984) con el programa Genetix v. 4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). También la riqueza alélica, que estima el número de alelos con independencia del tamaño muestral, por locus y por población con la ayuda del programa Fstat v. 2.9.3.2 (Goudet, 1995). Se aplicó un test de Friedman, implementado en el programa R (R Development Core Team 2009), para comparar la riqueza alélica y heterozigosidad esperada entre localidades. Mediante el programa Genepop v. 4.0 (Rousset, 2008) se llevaron a cabo test de bondad de ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg y de desequilibrio de ligamiento. La significación se calculó empleando un método de cadenas de Markov con valores para los parámetros *dememorization*, *batches* e *iterations per batch* de 10 000, 500 y 10 000, respectivamente. La presencia de alelos nulos se examinó con el programa MicroChecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004), utilizando el método de Brookfield (1996) para el cálculo de las frecuencias.

La diferenciación genética global y entre pares de localidades se calculó con el estimador F_{ST} de Weir y Cockerham (1984). La significación de los valores F_{ST} se evaluó mediante 10 000 permutaciones con ayuda del programa Genetix v. 4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). Además, se realizaron tests exactos para examinar la diferenciación alélica entre pares de muestras con Genepop v. 4.0 (Rousset, 2008). En todos los casos de comparaciones múltiples, los niveles de significación se establecieron después de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni para pruebas estadísticas múltiples (Rice, 1989). Se analizó la existencia de correlación lineal entre la distancia genética (calculada como $F_{ST}/(1-F_{ST})$) y la distancia geográfica entre pares de localidades (medida como la distancia en línea de costa entre las localidades muestreadas) mediante un test de Mantel con 10 000 aleatorizaciones utilizando el programa IBDWS v.3.21 (Jensen *et al.*, 2005). Se empleó el paquete Phylip-3.69 (Felsenstein, 1989) para construir árboles por el método de *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987) en base a valores de F_{ST} y/o la distancia genética de Nei (1978).

Para examinar gráficamente la relación entre las localidades se llevó a cabo un análisis factorial de correspondencias usando la opción "AFC 3D sur populations" del programa Genetix v. 4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). La estructura genética poblacional también se examinó mediante un método bayesiano de agrupamiento implementado en el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Para estimar el número de poblaciones o grupos, K, se utilizaron varios modelos que difieren en cómo se estima el origen de los individuos y en si se asume, o no, que las frecuencias alélicas de los grupos son independientes entre sí. El programa se ejecutó para valores de K entre 1 y el número de muestras analizadas, obteniéndose 10 réplicas para cada valor. Se escogió el valor de K que maximiza

ΔK (Evanno *et al.*, 2005), un estadístico basado en la tasa de cambio de la probabilidad de los datos entre valores sucesivos de K . Para mejorar la precisión del análisis se utilizaron únicamente individuos con genotipo multilocus completo.

2.3.2.6. Asignación de paternidades

Una vez obtenido el genotipo de reproductores y semilla, a cada descendiente se le asignó su pareja parental más probable con el programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998). Este programa calcula el índice de contenido polimórfico (PIC) de cada uno de los loci utilizados en el análisis y realiza simulaciones de asignación (generando descendencias virtuales a partir de la información de los reproductores) para evaluar la capacidad que tienen los marcadores usados de asignar correctamente un descendiente a su pareja real de reproductores. Estima el poder de exclusión que indica la probabilidad de excluir como padre de un determinado descendiente a cualquier padre del lote de reproductores de los que procede. Después de asignar el primer padre, el programa repite la búsqueda para seleccionar, entre el resto, el segundo candidato más probable teniendo en cuenta, en caso de conocerse, la complementariedad de sexo entre los individuos más probables.

2.3.2.7. Estimaciones del tamaño efectivo y del nivel de endogamia

El tamaño efectivo (N_e) se ha estimado teniendo en cuenta las tres situaciones posibles:

que participasen todos los individuos reproductores utilizados, lo que indicaría el nivel mínimo de endogamia que se generaría

considerando solamente los individuos que realmente dejan descendencia, y considerando la contribución diferencial de los individuos que intervienen

En los dos primeros casos se empleó la fórmula clásica $N_e = (4 * N_m * N_h) / (N_m + N_h)$, mientras que en el tercer caso se utilizó la fórmula propuesta por Chevassus (1989) donde:

$$N_e = 4(N-2) / [(M_h + V_h/M_h) + (M_m + V_m/M_m) - 2]$$

Siendo: N_e = tamaño efectivo; N = número total de individuos; M_h y M_m = media de descendientes por hembra o macho respectivamente; y V_h y V_m = varianza del número de descendientes por machos y hembras.

El incremento de endogamia (ΔF) por generación se estimó como $\Delta F = 1/2N_e$.

2.3.2.8. Marcadores basados en RFLPs de intrones

Se estudiaron 6 marcadores genéticos nucleares desarrollados por Cordero *et al.* (2008, 2012). Estos marcadores se basan en el estudio de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) de intrones (Tabla V). El genotipado de las muestras para estos marcadores se realizó mediante PCR y digestión con

enzimas de restricción, según se ha descrito previamente (Cordero *et al.*, 2008, 2012).

Tabla V.- Marcadores genéticos y cebadores de PCR empleados en este trabajo.

Marcador	Proteína codificada	Primers forward (F) y reverse (R)	Longitud producto PCR (pb)	Nº intrones detectados (longitud en pb)
<i>Ech</i>	Enoyl Coenzyme A hydratase	F: 5'-gaaattgcatgatgtgtga3' R: 5'-actgcctcatcgactacctg3'	1169	2 (558, 380)
<i>Fas</i>	Fasciclin-like protein	F: 5'-catattgcacatctgacg-3' R: 5'-gtgaccaaggagaaggttcc-3'	453	1(277)
<i>Srp54</i>	Small ribosomal protein 54 KD	F: 5'-ttaatgaagaaatcaacaagg-3' R: 5'-tgtctcgacgtgtgaagtgt-3'	542-853	1
<i>Tbp</i>	TATA Box binding protein	F: 5'-tgtgtacaggtgctaaaagg-3' R: 5'-ttcaataaggtgatctatcca-3'	583-597	1
<i>Trdmt</i>	tRNA aspartic acid methyltransferase	F: 5'-tctcatcacagtgccgctaca-3' R: 5'-cttgacctctgttgcatt-3'	1191	2(400, 567)
<i>Ubc</i>	Ubiquitin conjugating enzyme	F: 5'-tgtcaacaccagcaagaaga-3' R: 5'-catcctcaaatggggtatca-3'	988	2(119,717)

Análisis de datos de marcadores basados en RFLPs de intrones

Los genotipos individuales de cada almeja para los 6 marcadores genéticos se introdujeron en un archivo EXCEL, que se utilizó como base para elaborar los archivos de datos específicos para los distintos programas informáticos de análisis genético. Los individuos en los que la PCR falló en más de 2 marcadores, se excluyeron del análisis. Para calcular las frecuencias génicas y genotípicas se utilizó el programa GenePop v. 3.4 (Raymond y Rousset, 1995a). En el caso del marcador *Ech*, nuestros estudios anteriores demuestran la existencia de alelos nulos, que se refleja en fuertes déficits de heterocigotos. La estimación de las frecuencias de alelos nulos se realizó mediante un modelo de mutación aleatorio

(Chapuis y Estoup, 2007; Kalinowski y Taper 2006), utilizando el programa INEst (Chybicki y Burczyk, 2009). Para estudiar la variabilidad genética de las poblaciones se obtuvieron estimas insesgadas de la diversidad genética o heterozigosis por locus (Nei, 1978) mediante el programa Arlequin v. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). También se determinó el número medio de alelos por locus.

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se estimaron mediante el estadístico F_{IS} (Weir y Cockerham, 1984). La significación de estas desviaciones se determinó mediante tests exactos (Raymond y Rousset, 1995b). La significación para el conjunto de marcadores y de poblaciones se determinó mediante el método de Fisher (Sokal y Rohlf, 1991). Para todos estos cálculos se utilizó el programa GenePop v. 3.4 (Raymond y Rousset, 1995a).

La diferenciación genética de las poblaciones se estudió mediante diversos procedimientos. Se calcularon los valores del estadístico F_{ST} , que representa la varianza estandarizada de las frecuencias génicas entre poblaciones, para grupos de poblaciones y para todos los pares de poblaciones (Weir y Cockerham, 1984). La significación se determinó mediante tests exactos (Raymond y Rousset, 1995b) con el programa GenePop v. 3.4 (Raymond y Rousset, 1995a). Los valores de F_{ST} para todos los pares de poblaciones se utilizaron para comprobar el ajuste a un modelo de aislamiento por la distancia (IBD) (Slatkin, 1993; Rousset, 1997) mediante test de Mantel llevados a cabo con Arlequin v.3. Los valores de F_{ST} por parejas también se utilizaron para realizar un árbol de distancias mediante el método de *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007).

La relación entre diferenciación genética y geografía también se estudió mediante dos métodos de agrupamientos. En el análisis factorial de correspondencias, las frecuencias alélicas se utilizan como datos básicos en una tabla de contingencia analizada mediante un método multivariante. Este análisis se realizó con el programa Genetix v. 4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). Además se llevó a cabo un estudio bayesiano de estructura genética mediante el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000). Para este análisis hemos utilizado un modelo de mezcla poblacional con frecuencias génicas correlacionadas y con información *a priori* de las poblaciones, desarrollado especialmente para detectar variaciones geográficas más sutiles (Hubisz *et al.*, 2009). Se modelaron estructuras con un número de clusters (K) variable entre 1 y 10, con 10 réplicas por simulación. El valor de K con mejor ajuste se determinó buscando la mayor diferencia entre verosimilitudes (ΔK) para valores de K contiguos (Evanno *et al.*, 2005). Para la representación gráfica de las proporciones de cada clúster en cada individuo se realizó un promedio de todas las réplicas para el K seleccionado, mediante los programas Distruct y CLUMPP (Rosenberg, 2004; Jakobson y Rosenberg, 2007).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. SUBPROYECTO 1. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LA ALMEJA FINA EN CRIADERO

2.4.1.1. Línea 1. Determinación de los criterios de calidad de las puestas

2.4.1.1.1. Condiciones de Acondicionamiento

Se realizaron acondicionamientos a lo largo del año, desde el mes de enero a julio y en noviembre, con reproductores procedentes de distintos lugares de las comunidades de Andalucía, Asturias, Cataluña, Galicia y Murcia. La tabla VI muestra los distintos acondicionamientos llevados a cabo, la fecha de inicio de los mismos y las condiciones de estabulación como: tasas de renovación del agua en los tanques, expresado en litros por hora (L/H), temperatura y alimentación, así como la duración del acondicionamiento hasta que los reproductores llegan a la madurez sexual.

Tabla VI.- Condiciones de estabulación de los reproductores en los diferentes acondicionamientos realizados.

Procedencia	Inicio	Talla Renovación		Alimentación			Duración (Días)	
		(mm)	(L/H)	Volumen	Temperatura	Ración		Especies
Galicia	15-ene	43,5	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	75
Galicia	19-ene	44	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	79
Galicia	21-ene	45	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	103
Galicia	17-feb	44	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	55
Galicia	19-feb	40	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	89
Asturias	19-feb	42,5	45-60	150 L	18-19°C	10%	Iso, Pt, Ts	53
Asturias	24-feb	47	circ.cerrado	150 L	18-19°C	6-10%	Iso, Pt, Ts	69
Asturias	01-mar	43,5	45-60	150 L	17-19°C	6%	Iso, Pt, Ts	91
Andalucía	10-mar	37,2	50	40 L	20°C	5%	Iso, Pl, Ch, Sk	75
Galicia	12-mar	44,5	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	47
Galicia	13-mar	45,5	20-60	200 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	88
Cataluña	15-mar	43,37	60	60 L	19°C	4%	Iso, Ch, Pt	57
Galicia	15-mar	41,37	60	60 L	19°C	4%	Iso, Ch, Pt	57
Galicia	22-mar	45,5	20-60	150 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	70
Murcia	30-mar	33,47	60	60 L	19°C	4%	Iso, Ch, Pt	76
Galicia	07-abr		40	20 L	17°C	6%	Iso, Ch, Pt, Ts	63
Galicia	07-abr		40	20 L	20°C	6%	Iso, Ch, Pt, Ts	35
Asturias	15-abr	40,5	45-60	150 L	18-19°C	10%	Iso, Pt, Ts	40
Andalucía	20-abr	38,37	50	40 L	20°C	4-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Ts	45
Galicia	28-abr	44,5	20-60	150 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	55
Cataluña	11-may		40	60 L	17°C	2%	Iso, Ch, Pt, Ts, Rh	48
Cataluña	11-may		40	60 L	19°C	2%	Iso, Ch, Pt, Ts, Rh	45
Galicia	11-may		40	60 L	17°C	2%	Iso, Ch, Pt, Ts, Rh	31
Galicia	11-may		40	60 L	19°C	2%	Iso, Ch, Pt, Ts, Rh	24
Galicia	13-may	42,5	20-60	150 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	48
Galicia	19-may	42,5	20-60	150 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	47
Andalucía	25-may	40,25	50	40 L	20°C	4-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Ts	45
Asturias	17-jun	44	45-60	150 L	17-20°C	6%	Iso, Pt, Ts	64
Galicia	18-jun	43,5	20-60	150 L	17-19°C	3-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Pt, Ts	28
Asturias	19-jun	49	45-60	150 L	17-20°C	6%	Iso, Pt, Ts	42
Asturias	25-jun	39,5	45-60	150 L	17-20°C	6%	Iso, Pt, Ts	5
Andalucía	08-jul	40,18	50	40 L	20°C	4-6%	Iso, Pl, Ch, Sk, Ts	60
Asturias	15-jul	39,5	45-60	150 L	18-19°C	10%	Iso, Pt, Ts	3
Asturias	15-nov	39	45-60	150 L	14-18°C	6%	Iso, Pt, Ts	161
Asturias	15-nov	37,5	45-60	150 L	14-18°C	6%	Iso, Pt, Ts	_____

La talla media de los reproductores fue de 41,79 mm, la mayoría sobrepasaban la talla comercial (40 mm). No se observaron diferencias en el acondicionamiento por causa de la talla de los reproductores.

Se acondicionaron en tanques con diferente capacidad, desde los más pequeños de 20 litros, pasando por 40 y 60 litros, aunque la mayoría fueron tanques

grandes de 150-200 litros. Según los resultados, la capacidad de los tanques no es un factor relevante en el resultado del acondicionamiento.

Los reproductores se mantuvieron en circuito abierto, con tasas de renovación que oscilaron entre los 20 y los 60 litros por hora. Se probó también mantenerlos en circuito cerrado con renovación del agua cada dos días. Este factor tampoco influye en el éxito del acondicionamiento.

La comida suministrada fue una dieta mixta de varias especies microalgales, desde una dieta básica con tres especies: *Isochrysis* (*Iso*), *Phaeodactylum* (*Pf*) y *Tetraselmis* (*Ts*) y otras dietas donde, además de estas especies, se les añadía *Chaetoceros* (*Ch*), *Paulova* (*Pl*), *Rhodomonas* (*Rh*) y *Skeletonema* (*Sk*). La ración de comida osciló desde la más baja del 2% en peso seco de microalgas respecto al peso seco de los reproductores, hasta la más alta del 10%. Los reproductores llegaron a la madurez sexual con todas las dietas ensayadas.

La mayoría de los acondicionamientos llevados a cabo (94%) dieron como resultado la madurez y desove de los reproductores, aunque el tiempo necesario varió dependiendo sobre todo de la época del año en que se acondicionaron y de la temperatura. En general, se consiguió adelantar la maduración gonadal respecto al medio natural, con las condiciones utilizadas durante el acondicionamiento. El éxito del acondicionamiento no depende tanto de aspectos técnicos como el tipo de tanque o el flujo de renovación, sino que se ve más influenciado por el estado gametogénico inicial de los reproductores y la temperatura.

Los mejores meses para iniciar el acondicionamiento son desde enero hasta abril, en los cuales el adelanto en la maduración llega a ser de hasta tres meses respecto a los desoves que ocurren en el medio natural. El tiempo que tardan en madurar se va acortando según avanzan los meses, por ejemplo unos reproductores acondicionados en enero tardaron 75 días en madurar y otros acondicionados en abril tardaron 35 días. Los acondicionamientos que se inician en el otoño, o bien no llegan a madurar, o tardan más de cuatro meses, lo que no es rentable para el criadero.

La temperatura de acondicionamiento se mantuvo entre 17-20°C y es un factor importante, a mayor temperatura menos tiempo necesitan los reproductores para alcanzar la madurez, independientemente de la ración de comida suministrada.

En la tabla VII se muestran los resultados de dos acondicionamientos realizados a temperatura de 17°C y temperatura 19-20°C. Los reproductores acondicionados a 17°C tardaron casi el doble de días (63 días) en alcanzar la madurez frente a los reproductores estabulados a 20°C (35 días).

Tabla VII.- Condiciones de temperatura y alimentación en dos acondicionamientos puntuales. IC-PFVi/PFCo (Índice de Condición Visceral que relaciona el Peso Fresco de la Viscera frente al Peso Seco de la Concha).

Época	Temperatura	Alimentación		IC-PFVi/PFCo	Duración (días)
		Ración	Especies		
07-abr	17°C	6%	<i>Iso, Ch, Pt, Ts</i>	54,33	63
07-abr	20°C	6%	<i>Iso, Ch, Pt, Ts</i>	54,33	35
11-may	17°C	2%	<i>Iso, Ch, Pt, Ts, Rh</i>	62,91	31
11-may	19°C	2%	<i>Iso, Ch, Pt, Ts, Rh</i>	62,91	24

La mortalidad de los reproductores acondicionados fue prácticamente nula, excepto en episodios puntuales, en los que ocurrieron mortalidades masivas, dentro de un mismo lote, a los pocos días de estabularse en el criadero debido a que los reproductores presentaban patologías importantes

2.4.1.1.2. Seguimiento del grado de madurez gonadal

El seguimiento de la maduración gonadal durante el acondicionamiento se determina, sobre todo, en base a los valores del índice de condición y los estudios histológicos. Las diferentes comunidades que participaron en el proyecto utilizaron los índices que se describieron en el apartado de metodología. En general, todos los índices de condición aumentan conforme avanza el acondicionamiento.

De todos los métodos que se pueden usar para comprobar la madurez de la gónada, el más exacto es el estudio histológico del tejido gonadal. También aportan información los diferentes índices de condición que relacionan los pesos frescos y secos de la víscera y la gónada, frente al peso total o de las valvas. De todos ellos el más fácil y rápido para calcular, al no tener que diseccionar los individuos y tampoco se necesita procesamiento alguno, es el que relaciona el peso fresco de la víscera frente al peso fresco total, este es un índice válido para determinar el estado de madurez de la gónada acompañándolo de la observación al microscopio de un frotis gonadal.

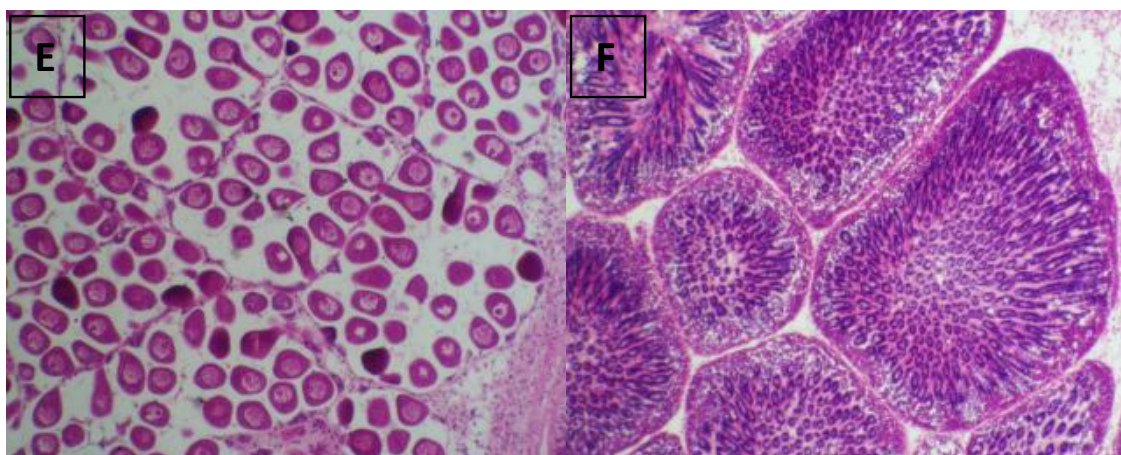
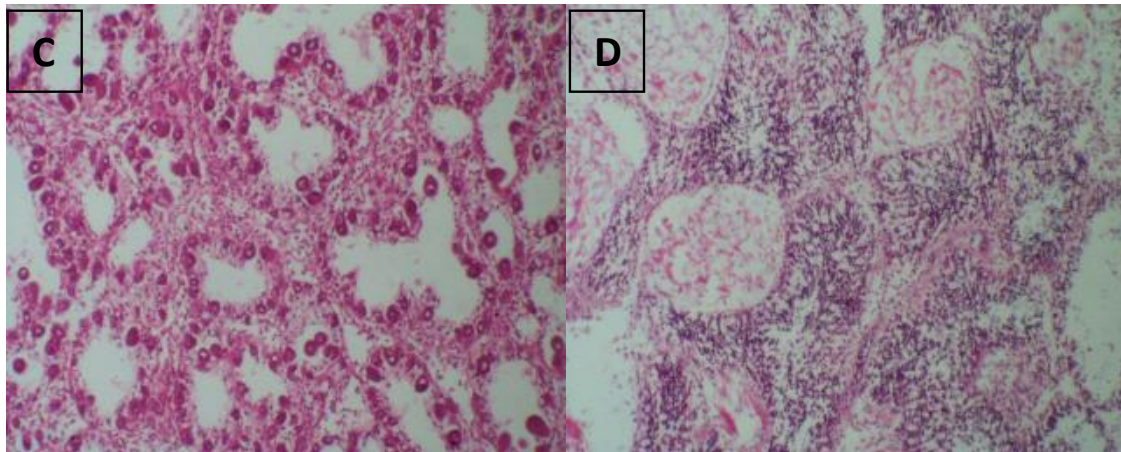
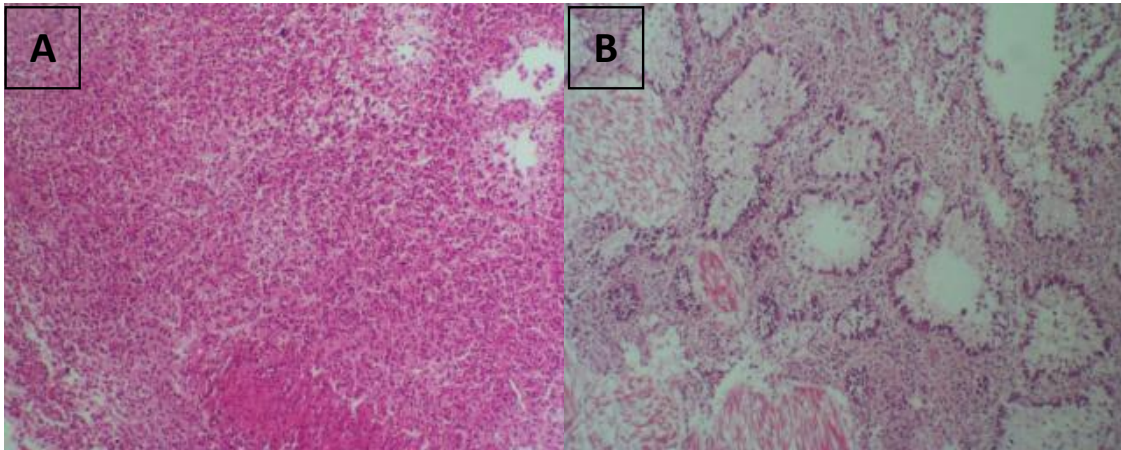
El valor de este índice varía dependiendo del estado de desarrollo gametogénico en que se encuentren los reproductores y de su procedencia. Normalmente cuando se comienzan los acondicionamientos, la mayoría de las almejas están en un estado de reposo y/o inicio de la gametogénesis, con unos valores del índice entre 22 y 28. A medida que avanza el acondicionamiento, este índice va aumentando hasta alcanzar en algunos casos una subida del 80%.

La siguiente tabla muestra los valores, tanto iniciales como finales, para este índice en los diferentes acondicionamientos llevados a cabo; así como la fase del estadio gametogénico en que se encontraban los reproductores al inicio de los mismos.

Tabla VIII.- Índices de condición de los distintos acondicionamientos realizados al inicio y al final de los mismos, así como el estado gametogénico que presentaban los reproductores al inicio del acondicionamiento.

Lugar de acondicionamiento	Procedencia	Época	I.C. Inicial	Estado gametogénico	I. C. Final
Galicia	Cambados	15-ene	24,3	Reposo-Inicio	28
Galicia	Cambados	19-ene	23	Inicio	30,6
Galicia	Espasante	21-ene	22,5	Reposo	35,1
Galicia	Illa	17-feb	21,9	Reposo	27,9
Galicia	Campelo	19-feb	23,8	Inicio	30,3
Asturias	Villaviciosa	19-feb	23	inicio	30
Asturias	Eo	24-feb	23	inicio	30
Andalucía	El Rompido	10-mar	25,3	-	28,96
Galicia	Cabo de Cruz	12-mar	33,9	Desarrollo	39,2
Galicia	Cambados	13-mar	22,8	Inicio	42,6
Galicia	Illa	22-mar	27,9	Inicio	34,1
Asturias	Eo	15-abr	23	-	26
Andalucía	I. Cristina	20-abr	34,68	-	38,92
Galicia	Cambados	28-abr	24,7	Madurez	28,2
Galicia	Cambados	13-may	27,6	Madurez	32,3
Galicia	Illa	19-may	29,2	Desarrollo	36,2
Andalucía	I. Cristina	25-may	34,5	-	34,48
Andalucía	I. Cristina	08-jul	35,58	-	35,59

Las siguientes fotografías ilustran los diferentes estadios gametogénicos.



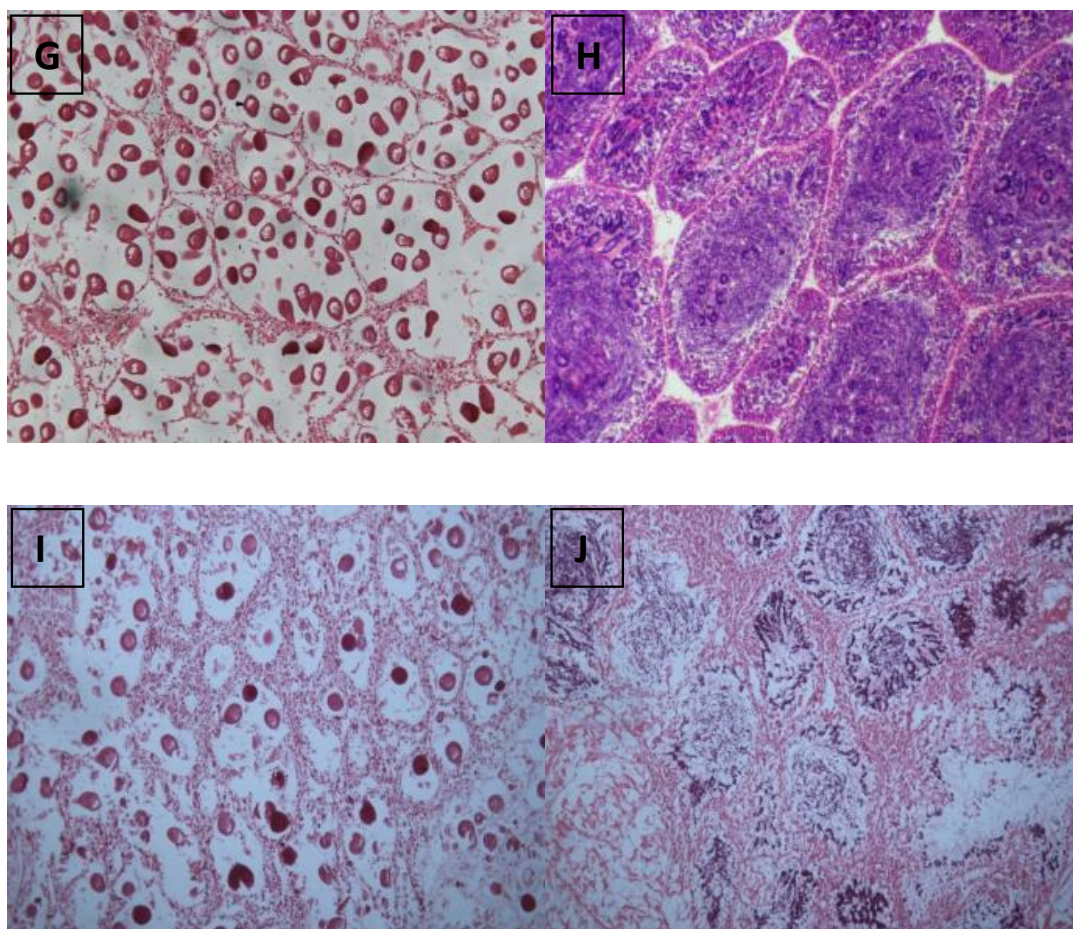


Figura 26.- Estadios gametogénicos de la almeja fina. A: Reposo sexual. B: Inicio del desarrollo gametogénico. C: Gametogénesis avanzada en hembras. D: Gametogénesis avanzada en machos. E: Madurez morfológica en hembras. F: Madurez morfológica en machos. G: Puesta en hembras. H: Puesta en machos. I: Postpuesta en hembras. J: Postpuesta en machos.

2.4.1.1.3. Evolución de los componentes bioquímicos en el acondicionamiento

La siguiente tabla muestra la variación de los componentes bioquímicos (proteínas, carbohidratos y lípidos) a lo largo de cuatro acondicionamientos llevados a cabo con almejas procedentes de dos localidades gallegas (Cambados y Cabo de Cruz) en los meses de enero, marzo y mayo.

Tabla IX.- Composición bioquímica de los componentes principales durante los acondicionamientos.

Lote	Fecha	Carbohidratos (µg/mg)	Proteínas (µg/mg)	Lípidos (µg/mg)
Cambados enero	ene-09	254,121 ± 3,72	293,474 ± 9,58	50,288 ± 1,09
	feb-09	177,789 ± 9,98	281,531 ± ,34	62,883 ± 3,57
	mar-09	86,069 ± 3,93	295,379 ± 5,99	128,290 ± 2,41
Cambados marzo	mar-09	149,447 ± 14,69	291,634 ± 14,15	56,32 ± 2,64
	abr-09	74,805 ± 0,20	313,719 ± 33,22	117,92 ± 3,55
Cabo Cruz marzo	mar-09	310,252 ± 21,41	59,917 ± 3,96	35,402 ± 1,52
	abr-09	174,893 ± 14,12	87,317 ± 8,57	96,711 ± 1,52
Cambados mayo	may-09	77,592 ± 7,69	305,223 ± 19,33	101,80 ± 1,80
	jun-09	27,540 ± 2,35	370,797 ± 16,14	133,84 ± 3,69

En la evolución del ciclo gametogénico en el medio natural y a medida que van madurando los reproductores, se producen variaciones en la composición bioquímica debido a la utilización de estos componentes en el proceso de desarrollo gonadal. Los componentes que más fluctúan son carbohidratos y lípidos. La cantidad de carbohidratos desciende en reproductores procedentes de Cambados, en el mes de enero tienen 254,121 µg/mg, en marzo 149,447 y en mayo 77,59. En cuatro meses el descenso en carbohidratos es del 69,4%. Durante el acondicionamiento en el criadero sucede lo mismo, pero debido a las condiciones a que son sometidos los reproductores, este descenso es mucho mayor, ya que en el acondicionamiento de enero con reproductores de Cambados el descenso es del 66% en sólo dos meses.

Los lípidos aumentan considerablemente durante la gametogénesis, así en el medio natural, desde enero a mayo se duplica la cantidad de lípidos y dentro del criadero el aumento es igual pero sucede en menos tiempo, por eso en los acondicionamientos que empiezan en enero se consigue adelantar la madurez de los reproductores en dos o tres meses, respecto al medio natural.

Al examinar los datos bioquímicos de machos y hembras se observa que, la mayor diferencia entre ambos sexos se da en la acumulación de lípidos, donde las hembras mantienen una mayor proporción a medida que su estado de maduración aumenta (Tabla X).

Tabla X.- Variación en porcentaje de la composición bioquímica (desde el primer muestreo: T₂ al último: T₉) de almejas catalanas (C), gallegas (G) y murcianas (M) 2010. Machos en rojo y hembras en azul.

	Lip	CH	Prot	Lip	CH	Prot	Lip	CH	Prot	
Variación T ₂ -T ₉	C	1,6	-10,6	1,2	2,6	1,2	-11,6	-4,8	1,6	-1,2
	G	4,2	-16,4	8,0	3,4	5,4	-16,1	3,7	2,7	-16,6
	M									

Los datos de Índice de Condición (IC) reflejan que las almejas catalanas y gallegas presentan una deficiente maduración. No así en el caso de las de origen murciano, las cuales presentaron una maduración a todos los efectos correcta. Dado que en el muestreo 7 del 14/06/2010, su Índice de Condición muestra su máximo valor (87,49), se puede relacionar este dato con el de la composición bioquímica en este mismo punto de muestreo pudiendo obtener así, los valores óptimos (Tabla XI) para estos progenitores en cuanto a: % de proteínas, % lípidos y % de carbohidratos en machos y hembras (Figura 27).

Tabla XI.- Valores óptimos de la composición bioquímica, en machos y hembras, obtenida cuando el Índice de Condición también es óptimo en los progenitores procedentes de Murcia. Machos en rojo y hembras en azul.

	IC	% Lip	% CH	% Prot
Murcia	87,49	6,7	6	39
		12,7	6,7	39,8

Analizando el estado de maduración de cada individuo mediante los índices de condición (IC) e índice de condición gonadal (IG), y relacionándolos con los análisis bioquímicos de cada uno de ellos, pudimos establecer un valor óptimo para cada una de las fracciones bioquímicas en un estado de plena maduración.

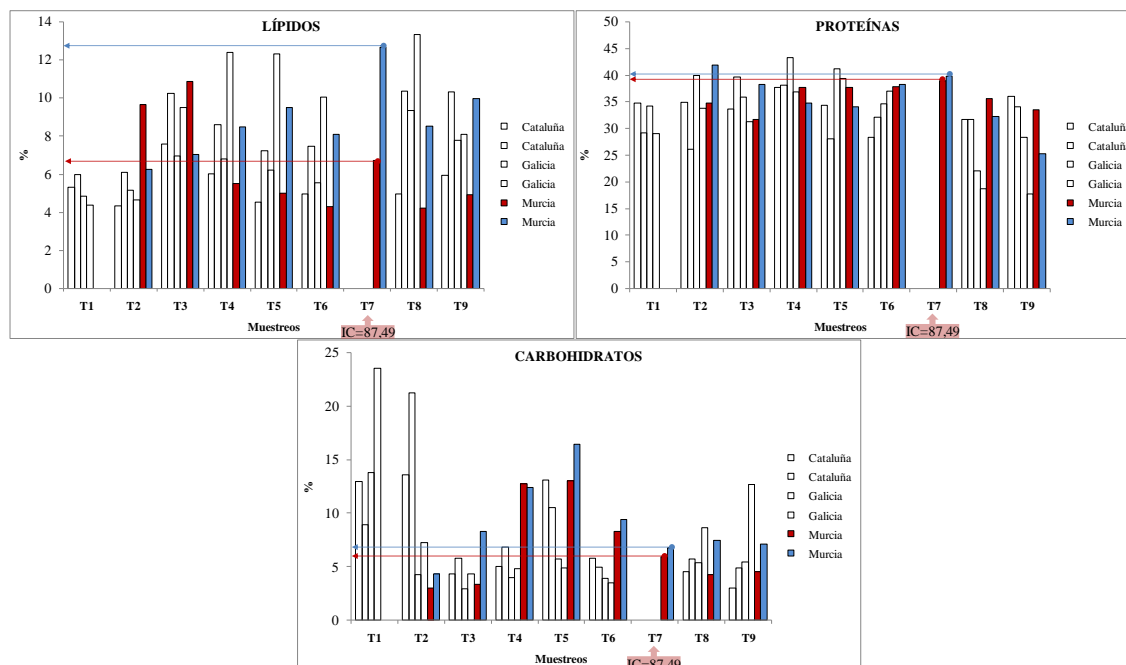


Figura 27.- Representación de los porcentajes de las composiciones bioquímicas, en los progenitores de Murcia, en relación con el Índice de condición.

A nivel de los ácidos grasos analizados, este aumento (desde el muestreo T₂ al T₉) se observa sobretodo en los saturados, monoinsaturados y poliinsaturados ω₆ en los tres lotes (de distinta procedencia) estudiados (Tabla XII). Sin embargo, en las almejas procedentes de Cataluña (C) y de Galicia (G), sobretodo en estas últimas, este acúmulo no es homogéneo y tanto tiene lugar en machos como hembras pero, en las procedentes de Murcia (M), son las hembras las que presentan un mayor aumento de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

Tabla XII.- Variación en porcentaje de ácidos grasos (desde el primer muestreo: T₂ al último: T₉) de almejas catalanas (C), gallegas (G) y murcianas (M) 2010. Machos en rojo y hembras en azul.

	SAT	MUF	PUF ω ₆	PUF ω ₃	ω ₃ /ω ₆	SAT	MUF	PUF ω ₆	PUF ω ₃	ω ₃ /ω ₆	SAT	MUF	PUF ω ₆	PUF ω ₃	ω ₃ /ω ₆
Variación T ₂ -T ₉															
C	10,3	5,6	7,7	-13,8	-4,1	5,3	1,0	3,4	-7,5	-2,4	5,3	2,5	8,1	-8,4	-6,2
G	6,5	5,2	5,2	-7,5	-2,3	-2,8	-3,8	8,3	-0,3	-3,0	14,4	9,1	3,5	-14,9	-2,9
M															

Relacionando los resultados obtenidos al analizar los ácidos grasos en machos y hembras de los progenitores de Murcia son su IC en el muestreo 7, también podemos perfilar las cantidades óptimas de % de Saturados, % Monoinsaturados, % Poliinsaturados ω₆, % Poliinsaturados ω₃ y la relación ω₃/ω₆ (Tabla XIII; Figura 28).

Tabla XIII.- Valores óptimos de la composición de ácidos grasos, en machos y hembras, obtenida cuando el Índice de Condición también es óptimo en los progenitores procedentes de Murcia. Machos en rojo y hembras en azul.

	IC	% SAT	% MUF	% PUF ω ₆	% PUF ω ₃	ω ₃ /ω ₆
Murcia	87,49	18,6	16,1	17,9	38,6	2,2
		26	19	20,2	29	1,4

De igual manera se analizó la composición de ácidos grasos, y su evolución a lo largo del acondicionamiento, comparándola con la atribuida a los ejemplares que mejores condiciones de maduración presentaron.

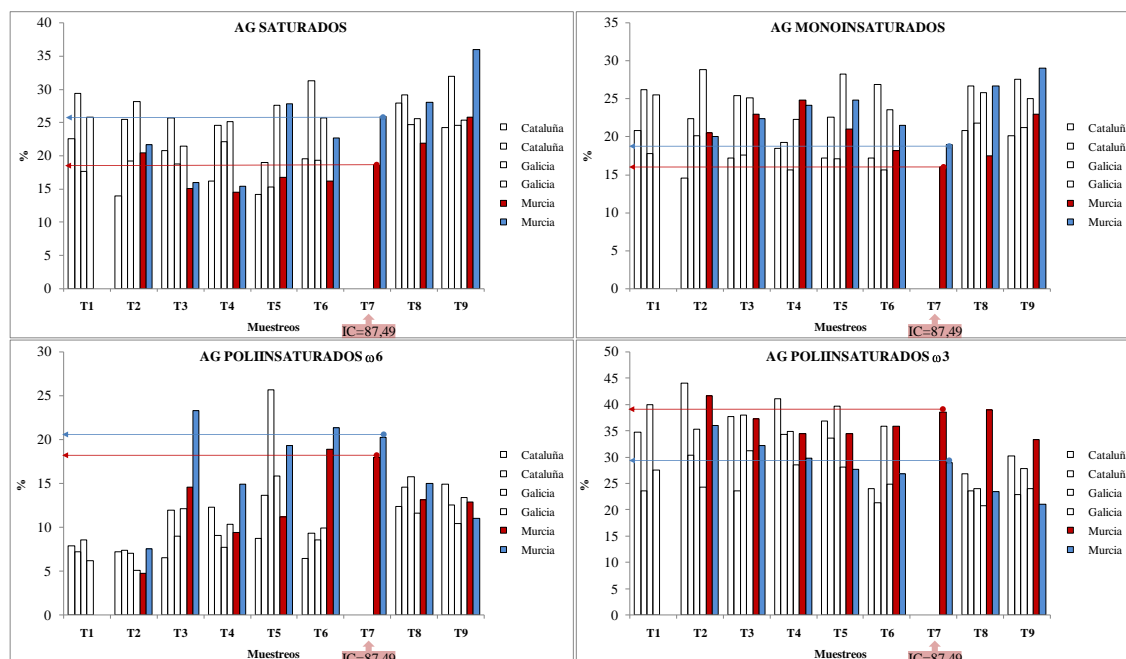


Figura.28.- Representación de los porcentajes de las composiciones en ácidos grasos, en los progenitores de Murcia, en relación con el Índice de condición.

Al igual que en los valores de bioquímica, no se ve una concordancia entre los valores de los grupos de ácidos grasos respecto a los valores óptimos de maduración, en el caso de las almejas catalanas. Lo mismo pasa con las procedentes de Galicia. En el caso de las de origen murciano, al igual que sucede con la distribución bioquímica de lípidos, carbohidratos y proteínas, la concordancia es bastante notable en la misma fecha. En el caso de las de origen murciano, al igual que sucede con la distribución bioquímica de lípidos, carbohidratos y proteínas, la concordancia es bastante notable en la misma fecha.

2.4.1.1.4. Inducción a la puesta

La técnica empleada para la inducción de las puestas por “choque térmico” da buenos resultados para esta especie, llegando a ser positiva hasta en el 89% de los intentos, teniendo en cuenta determinados aspectos:

Recipiente para realizar la inducción

El lugar para llevar a cabo la inducción ha de ser una zona del criadero tranquila, evitando así vibraciones y cambios en la luz que pueden favorecer que las almejas dejen de sifonar y la estimulación térmica no sea la adecuada. La respuesta de los reproductores a la inducción se consigue, en la mayoría de los casos, varias horas después de los choques térmicos, una vez que las almejas están ya en los tanques de acondicionamiento con agua entre 18 y 20°C. Por

esto, es preferible realizar la inducción en los mismos tanques donde están estabuladas las almejas, en lugar de inducirlas en recipientes más pequeños.

Tratamiento térmico durante la inducción

Aunque se han probado diferentes temperaturas para inducir la puesta en la almeja fina, no se ha observado una relación directa entre las temperaturas empleadas y el resultado de las inducciones.

Las diferencias entre las temperaturas mínima y máxima empleadas para que sean efectivas tienen que ser de al menos 10°C. Además, hay que tener presente de dónde proceden los reproductores (aguas frías del Atlántico o aguas más calientes del Mediterráneo), porque de ello dependerá el rango de temperaturas que debemos emplear durante la inducción.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los diferentes regímenes de temperaturas que se han probado para optimizar la técnica de inducción térmica o “choque térmico”.

Tabla XIV.- Temperaturas utilizadas para inducir la puesta.

Tª máx. (°C)	Tiempo (min)	Tª mín. (°C)	Tiempo (min)
24	-	14	-
25	-	12	-
26	-	12	-
28	20-60	10	20-60
27-25	20	15	20
26-25	90	14-13	30

Tratamiento previo a la inducción

La exposición de los reproductores a un período en seco favorece la respuesta de las almejas a la inducción. Se ha observado que existen diferencias con la temperatura durante esta estimulación previa a la inducción. Cuando las almejas son mantenidas a baja temperatura (5°C) durante el período en seco, se obtiene antes el desove, pero muchos progenitores mueren sin haber desovado, sin embargo, cuando la temperatura es más templada (Tª ambiente ≈ entre 14 y 20°C), aunque se tarda un poco más de tiempo en obtener la puesta, no se observa mortalidad en los reproductores (tabla XV) .

Tabla XV.- Condiciones previas a la inducción de la puesta. Cuando se habla de Tª ambiente, se refiere a una temperatura entre 16 y 20°C.

Lugar	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
Nevera	5	12
Cámara isoterma	20	12
Nevera	4	1
Tanque acondicionamiento	Tª ambiente	2
Tanque acondicionamiento	Tª ambiente	1
Nevera	4	2 - 18
Tanque acondicionamiento	Tª ambiente	2 - 18

2.4.1.1.5. Composición bioquímica de los huevos de diferentes puestas

La composición bioquímica de los ovocitos obtenidos en algunas de las diferentes puestas se muestra en la tabla XVI. Los progenitores participantes en las puestas fueron de distintas localidades: Cataluña (CAT), Galicia (GAL), Murcia (MUR) y Huelva (HUEL).

Tabla XVI.- Composición bioquímica (expresado en porcentaje) de los ovocitos obtenidos de progenitores de distinto origen: Cataluña (CAT), Galicia (GAL), Murcia (MUR) y Huelva (HUEL). En el caso de los ovocitos de progenitores de Huelva, los datos corresponden a la media obtenida de la composición de todos los ovocitos obtenidos en distintas puestas.

Puesta	% LIP	% CH	% PROT
CAT 11-5-10	6,35	1,69	12,95
GAL 11-5-10	10,69	4,27	33,3
GAL 25-5-10	6,35	0,83	10,03
MUR 25-5-10	8,94	2,34	22,71
HUEL (Media)	11,96	4,42	74,48

En todos los casos, las proteínas son los componentes mayoritarios seguidas de los lípidos (desde un 6,4% a un 11,96%).

Se da también una composición media de ácidos grasos de todos los ovocitos muestreados y como resultado de todos los análisis, se obtuvieron unos valores medios que permiten comparar las cantidades de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados ($\omega 6$ y $\omega 3$) encontradas en ovocitos de progenitores de Cataluña, Galicia, Murcia y Huelva (Tabla XVII).

Tabla XVII.- Datos en porcentaje de principales grupos de ácidos grasos de los ovocitos obtenidos de progenitores de distinto origen: Cataluña (CAT), Galicia (GAL), Murcia (MUR) y Huelva (HUEL). En el caso de los ovocitos de progenitores de Huelva, los datos corresponden a la media obtenida de la composición de todos los ovocitos obtenidos en distintas puestas.

Puesta	% SAT	% MUFA	% ω6 PUFA	% ω3 PUFA
CAT 11-5-10	37,04	33,94	10,27	18,74
GAL 11-5-10	38,09	37,78	9,3	11,95
GAL 25-5-10	31,97	32,24	15,4	16,63
MUR 25-5-10	22,51	25,34	27,16	21,58
HUEL (Media)	46,26	21,85	5,76	14,81

Los ácidos grasos saturados (SAT) en casi todos los ovocitos estudiados en este proyecto, presentan los valores más altos (del 22,51% al 46,26%), destaca también el alto contenido en monoinsaturados (MUFA) aunque su valor es menor en los ovocitos cuyos progenitores eran de Huelva. De los poliinsaturados destacan los ω3 que, en todos los casos menos en los ovocitos con progenitores de Murcia, presentan cantidades mayores (de 11,95% a 21,58%) que los observados para los ω6 (de 5,76% a 15,4%, excepto para los de Murcia que llegan al 27,16%).

Por otra parte, a los ovocitos de todas las puestas obtenidas con los progenitores de Huelva, se les efectuó un estudio más exhaustivo para determinar si existían diferencias significativas entre ellos, tanto a nivel de composición bioquímica como de ácidos grasos.

En la figura 29 se representan los porcentajes de la composición bioquímica de todos los ovocitos obtenidos en las puestas de progenitores de Huelva.

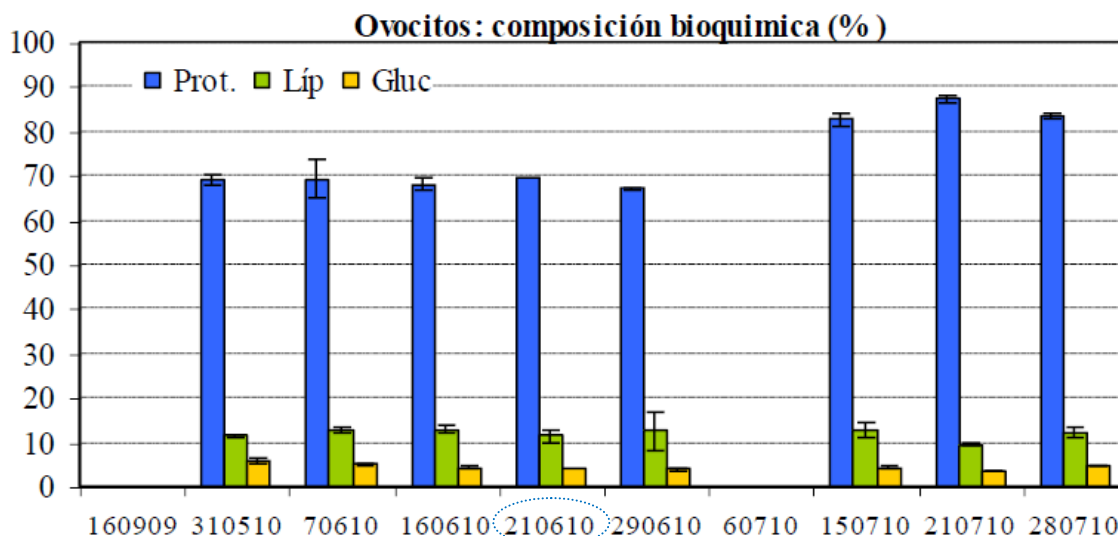


Figura 29.- Composición bioquímica de los ovocitos (%) en las distintas puestas obtenidas con progenitores de Huelva. Todas son obtenidas de individuos acondicionados, excepto las de 21/06/2010 que es de individuos del medio natural.

Comparando sus composiciones bioquímicas, no existen diferencias significativas para las proteínas (K-W ANOVA; $p=0.1154$), en cambio hay diferencias significativas en los lípidos y en los carbohidratos (ANOVA; $p=0.0035$).

El total de ácidos grasos en estos ovocitos, respecto al peso seco, representa un $57,96 \pm 26,72\%$ de los lípidos totales. El contenido ($\mu\text{gr}/\text{mg PS}$) en los principales grupos (saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, dimetil acetal, $\omega 3$, $\omega 6$, $\omega 9$ y $\omega 3\text{HUFA}$) de ácidos grasos de los ovocitos analizados, se muestra en la siguiente figura (Figura30).

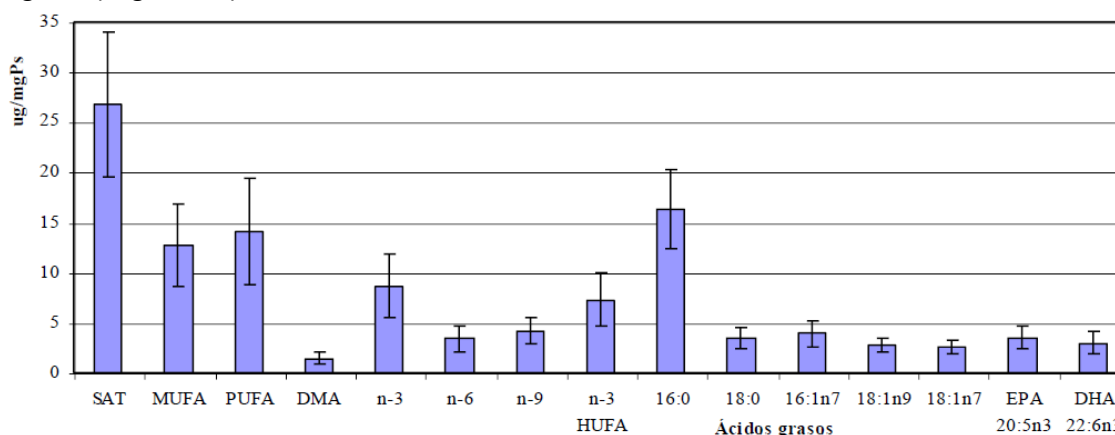


Figura 30.- Composición en ácidos grasos de los ovocitos ($\mu\text{gr}/\text{mg PS}$) de progenitores de Huelva, en los lípidos totales por grupos: saturados (SAT), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), dimetil acetal (DMA), n-3, n-6, n-9, n-3HUFA.

Con los datos de los análisis de ácidos grasos realizados a los ovocitos de estas puestas (de progenitores de Huelva) se observó que, las diferencias significativas son muy aleatorias sin quedar definido un patrón entre éstas respecto a su

evolución posterior, aunque podemos destacar que hay diferencias significativas (ANOVA; $p=0.000$) respecto al 22:6n3 y al 20:5n3, por su alto valor en los ovocitos procedentes de individuos del medio natural (Tabla XVIII).

Tabla XVIII.- Grupos homogéneos según el test de Duncan, en cuanto al EPA (20:5n3) y al DHA (22:6n3), entre los ovocitos de las distintas puestas (en azul la puesta del medio natural)

Variable: 22:6n3					Variable: 20:5n3							
Puesta	Media	1	2	3	4	Puesta	Media	1	2	3	4	5
05jun09	1,232	****				15sep09	1,136	****				
15sep09	1,301	****				7jun10	2,621		****			
29jul10	2,397	****	****			31may10	3,153		****	****		
7jun10	2,554		****	****		05jun09	3,229		****	****	****	
31may10	3,355		****	****	****	15jul10	3,363		****	****	****	
15jul10	3,435		****	****	****	29jul10	3,580		****	****	****	
16jun10	3,481		****	****	****	16jun10	3,613		****	****	****	
21jul10	3,753			****	****	29jun10	4,233			****	****	
21jun10	4,055				****	21jul10	4,576				****	****
29jun10	4,155				****	21jun10	5,744					****

Así mismo, si comparamos la composición en cuanto a los principales grupos de ácidos grasos entre los ovocitos de las distintas puestas, no hay diferencias significativas entre los ovocitos de las puestas que han alcanzado mayor supervivencia y el resto (Figura 31), pero hay que resaltar las diferencias entre los ovocitos obtenidos de individuos del medio natural y los obtenidos de individuos acondicionados, ya que los primeros presentan valores más elevados para la relación n3/n6 (Kruskal-Wallis; $p=0.0316$), y valores menores en AA/DHA y AA/EPA (K-W; $p=0.0073$ y ANOVA; $p=0.000$, respectivamente (Figura 31). Los ovocitos del medio natural también poseen un valor más elevado de MUFAs, $\omega 6$ y $\omega 9$.

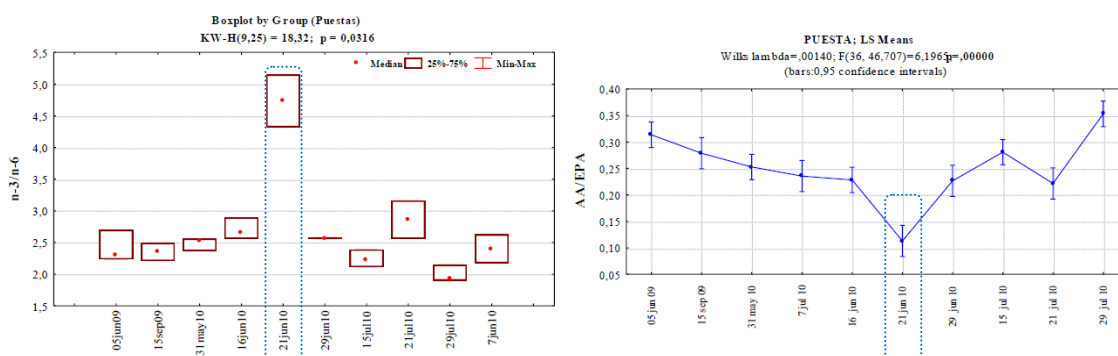


Figura 31.- Distribución a lo largo de las distintas puestas de los resultados del ANOVA para las relaciones $\omega 3/\omega 6$ (K-W) y AA/EPA (ANOVA).

De todas estas comparaciones entre las puestas conseguidas con los progenitores de Huelva, se pueden resaltar los siguientes resultados:

En la composición bioquímica en los ovocitos de las distintas puestas, no existen diferencias significativas para las proteínas, en cambio hay diferencias significativas en los lípidos totales y en los carbohidratos.

El análisis de ácidos grasos en los ovocitos muestra que los más abundantes fueron los saturados (16:0) y los poliinsaturados (ω 3 HUFA: DHA y EPA).

No se observaron diferencias en la composición de ácidos grasos en ovocitos entre puestas con éxito o que sufrieron altas mortalidades.

Hay diferencias significativas entre los ovocitos obtenidos del medio natural y los obtenidos de individuos acondicionados, ya que presentan un valor elevado de MUFA, PUFA, DMA, ω 3 y ω 6, así como de los ácidos grasos 20:4n3, 18:4n1, 16:4n1 y EPA y DHA.

2.4.1.2. Línea 2. Cultivos larvarios y realización de pruebas de alimentación larvaria

2.4.1.2.1. Condiciones generales de los cultivos larvarios

Durante la duración del proyecto, se han alternado cultivos larvarios con fines productivos (producción de semilla), empleando la metodología utilizada habitualmente, con cultivos larvarios experimentales, en los cuales se han ensayado diferentes condiciones que pudieran optimizar los rendimientos larvarios.

Se emplearon temperaturas diferentes a lo largo de los años. Éstas siempre se mantuvieron dentro de un rango entre 18 y 22°C. No se comprobaron diferencias notables de unas temperaturas a otras, si bien se pudo apreciar una pequeña diferencia en el crecimiento, algo más bajo con las temperaturas inferiores. Si se aumenta la temperatura de cultivo, el crecimiento larvario se acelera, pero si es demasiado alta, conlleva que se acelere el metabolismo y haga que las larvas no acumulen suficientes reservas energéticas para pasar con éxito la etapa de metamorfosis.

La supervivencia es un factor muy importante a considerar cuando se analiza el cultivo larvario de una especie. En este sentido, observamos que los resultados son muy variables y que, en principio, no existe ningún factor al que se pueda relacionar con altas o bajas supervivencias, excepto las mortalidades masivas y puntuales que acaban con todo un desove en pocos días, y que normalmente se pueden asociar a la aparición de patógenos vibriales (Línea 3).

Tipos de tanques

Se emplearon diferentes tanques con el propósito de evaluar cómo el contenedor puede influir en la viabilidad del cultivo larvario. Aunque harían falta más pruebas para poder asegurar que las diferencias entre los rendimientos son provocadas por lo distintos tanques, se observa que los tanques de polietileno con base plana ofrecen mejores resultados, tanto para el cultivo larvario como para la posterior etapa de fijación, sobre todo en lo referente a la supervivencia, y no tanto respecto al crecimiento larvario obtenido en cada tipo de tanque (Tabla XIX).

Tabla XIX.- Supervivencia y talla final de las larvas cultivadas comparando la forma y el material de dos tipos de tanque ensayados.

Tipo tanque	Material	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla final ($\mu\text{m}\pm\text{sd}$)
Cilindrico base plana	Polietileno	25	90,0	241 \pm 8,5
Tronco-cónico	Fibra	25	44,0	239 \pm 6,5
Tipo tanque	Material	Días de fijación	Supervivencia (%)	Talla final (mm \pm sd)
Cilindrico base plana	Polietileno	30	100,0	1,34 \pm 0,25
Tronco-cónico	Fibra	30	70,0	1,28 \pm 0,33

Sistemas de renovación de agua. Circuito cerrado y abierto

Los resultados de la prueba en la que se comparó el circuito cerrado frente al abierto en el cultivo larvario, se muestra en la siguiente figura. En cuanto a crecimiento, se encontraron diferencias significativas entre las cultivadas en circuito abierto libre y circuito cerrado respecto a las de circuito abierto conectado a una reserva, (K-W; $p=0.002$), siendo este último tratamiento el que obtuvo peores resultados, aunque esta diferencia se debe a una de las réplicas de este sistema, que tuvo un crecimiento mucho menor. De esta forma, comparando los otros cinco cultivos no se obtuvieron diferencias significativas en crecimiento (K-W ANOVA; $p=0.176$).

Hay que resaltar también la baja supervivencia larvaria al final del cultivo en circuito cerrado (5,16%).

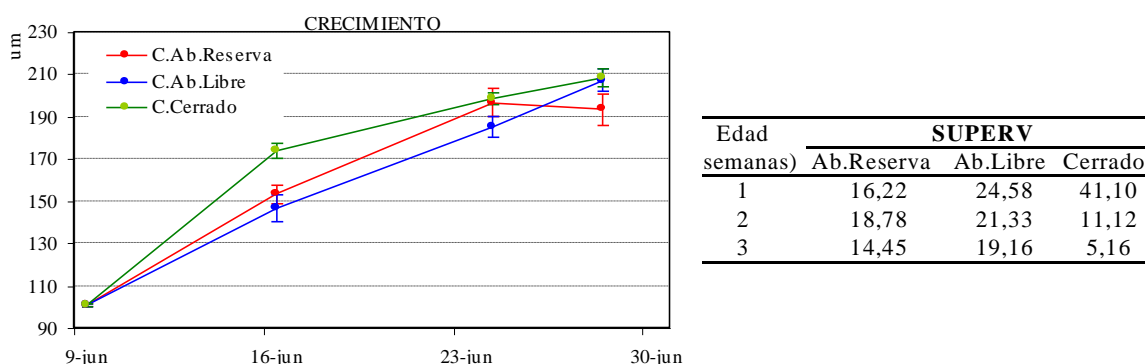


Figura 32.- Evolución del crecimiento y supervivencia de los cultivos en Circuito Abierto-Reserva, Circuito Abierto-Libre y Circuito Cerrado.

Densidad larvaria

Durante estos años, a excepción de una prueba en la que se compararon dos densidades de cultivo larvario distintas, cada cultivo larvario se ajustó a una densidad inicial de larvas D diferente. Como estas larvas se mantuvieron en el mismo tanque durante su desarrollo, la densidad final dependió de la supervivencia. Al analizar todos los cultivos en función de su densidad inicial, no se observó que existiera una relación directa entre la supervivencia hasta el momento de fijación y la densidad inicial.

No obstante, los resultados de la prueba en las que se compararon distintas densidades, una considerada normal (5 larvas/mL) y otra muy baja (0,6 larvas/mL), muestran que se obtienen mejores resultados, tanto en supervivencia como en crecimiento, a bajas densidades (Tabla XX). Además el uso de densidades bajas facilitan el manejo y favorecen el buen desarrollo del cultivo.

Tabla XX.- Supervivencia y talla final de las larvas cultivadas a diferentes densidades.

Densidad (larvas/mL)	Días de cultivo	Supervivencia (%)	Talla final ($\mu\text{m}\pm\text{sd}$)
5	25	44,0	239 \pm 6,50
0,6	25	66,0	245 \pm 12,4
Densidad (larvas/mL)	Días de fijación	Supervivencia (%)	Talla final (mm \pm sd)
5	30	70,0	1,28 \pm 0,33
0,6	30	100,0	1,66 \pm 0,42

2.4.1.2.2. Cultivo de fitoplancton

Composición bioquímica del fitoplancton de matraz. Efecto de la época del año en que se cosecha y la edad del cultivo

En las siguientes figuras (Figuras 33 y 34) se muestran los resultados por edad de cultivo y por época del año para las proteínas, carbohidratos y lípidos, teniendo en cuenta todos los muestreos realizados a lo largo del proyecto para cada una de las especies (cultivo en matraz).

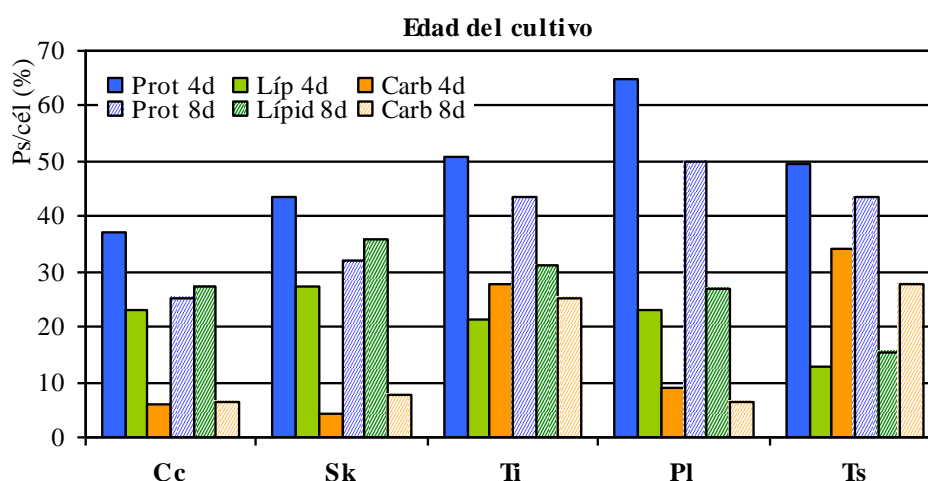


Figura 33.- Composición bioquímica (%) de las cinco especies de fitoplancton estudiadas y en las dos edades de los cultivos.

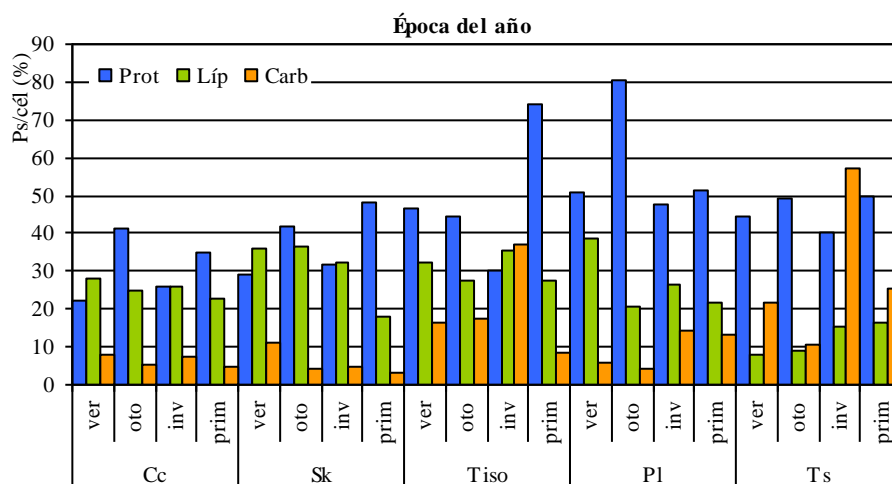


Figura 34.- Composición bioquímica (%) de las cinco especies de fitoplancton estudiadas en las distintas épocas del año.

Comparando la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos) del fitoplancton muestreado en distintas épocas del año y con dos edades del cultivo, no hay diferencias significativas respecto a la *edad* (4 y 8 días), en ninguno de los compuestos y para ninguna de las cinco especies estudiadas, excepto en *T-Iso* que presenta diferencia significativa (K-W Anova; $p=0.0082$), pero esta diferencia está vinculada principalmente a una muestra de verano, que tiene un valor en el cultivo de 8 días muy elevado (56%), sin dicha muestra los resultados no serían significativos (Anova; $p=0.052$).

En cuanto a la *época del año*, el fitoplancton presenta una mayor diversidad, siendo *T-Iso* la única especie que no presenta diferencias significativas en ninguno de los compuestos estudiados a lo largo del año. En el resto de las especies, hay homogeneidad en proteínas a lo largo del año, excepto en *C. calcitrans* que tiene diferencia significativa (ANOVA; $p=0.027$), hallándose esta diferencia (*post-hoc*: test Tukey) entre las muestras de verano (22%) y primavera (35%). Respecto a los lípidos, *C. calcitrans*, *S. costatum* y *T-Iso* no presentan variaciones a lo largo del año, pero *T. suecica* y *P. lutheri* tienen diferencias significativas (K-W ANOVA; $p=0.038$ y $p=0.017$, respectivamente), siendo similares entre sí las muestras de verano-otoño y primavera-invierno en *T. suecica*, y verano-invierno y primavera-otoño en *P. lutheri*.

Los carbohidratos son los que presentan una mayor desigualdad, y al realizar un test *post-hoc* (Tukey) entre las especies con diferencias significativas se revela solamente un patrón similar entre *T. suecica* y *P. lutheri*, presentando homogeneidad las muestras de verano-otoño y las de invierno-primavera en ambas. Las diatomeas (*Cc* y *Sk*) no presentan en carbohidratos un patrón en sus grupos homogéneos similar entre ellas, ni con las demás especies que muestran diferencias significativas.

La única especie que ha presentado interacción entre los dos factores estudiados (*época del año* y *edad del cultivo*) ha sido *S. costatum* en proteínas. Al realizar el test *post-hoc*, los grupos homogéneos revelan que la muestra de verano de 8 días

difiere de la muestra de primavera de 4 días, pero ambas son homogéneas con el resto de las muestras.

Podemos concluir que el fitoplancton no tiene variaciones en su composición bioquímica total entre las dos edades estudiadas, 4 y 8 días de cultivo y, en cambio, respecto a la época del año, presentan variaciones todas las especies excepto T-Iso, a pesar de llevarse a cabo los cultivos en una cámara en condiciones controladas. Estas variaciones afectan sobre todo al valor de los carbohidratos (en 4 especies) y a los lípidos (en 2 especies).

Composición bioquímica del fitoplancton cultivado en un sistema en continuo

Las condiciones más favorables para el cultivo del fitoplancton y que aplicamos en la actualidad son: nutrientes (Solución C) añadiendo vitaminas (Vitaminas B1 o tiamina: 2 g; Vitaminas H o biotina: 0,25 g y Vitaminas B12 o cianocobalamina: 0,25 g.); aporte de CO₂ en el agua utilizada para el cultivo a fin de disminuir el pH hasta 6 y luz discontinua (Fotoperiodo 18:6).

Optimizada y estandarizada la producción del sistema, se realizaron análisis bioquímicos (proteínas, lípidos y carbohidratos) y de ácidos grasos de las distintas especies.

En la figura 35 se muestran los contenidos porcentuales de los componentes bioquímicos. Proteínas y lípidos son los mayoritarios. T-Iso tiene el porcentaje más alto en proteínas (48%) y PI, lo tiene en los lípidos (42%).

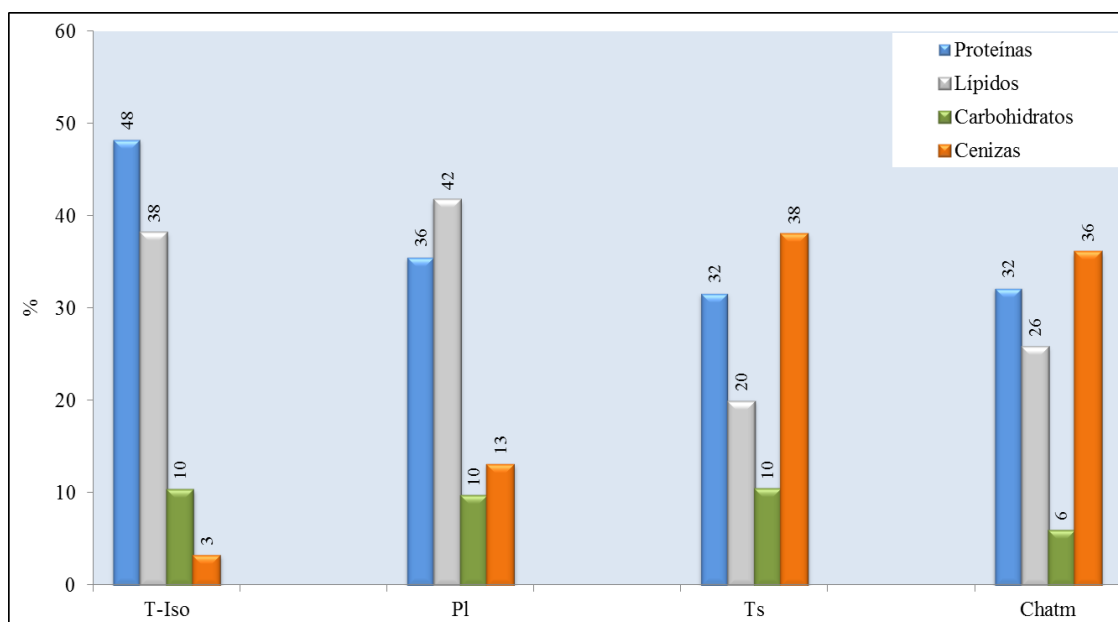


Figura 35.- Composición bioquímica (%) de las especies de fitoplancton cultivadas en el sistema Continuo bajo las condiciones óptimas definidas. *Isochrysis galbana*/T-Iso (T-Iso); *Pavlova lutheri* (PI); *Tetraselmis suecica* (Ts) y *Chaetoceros muelleri* (Chatm).

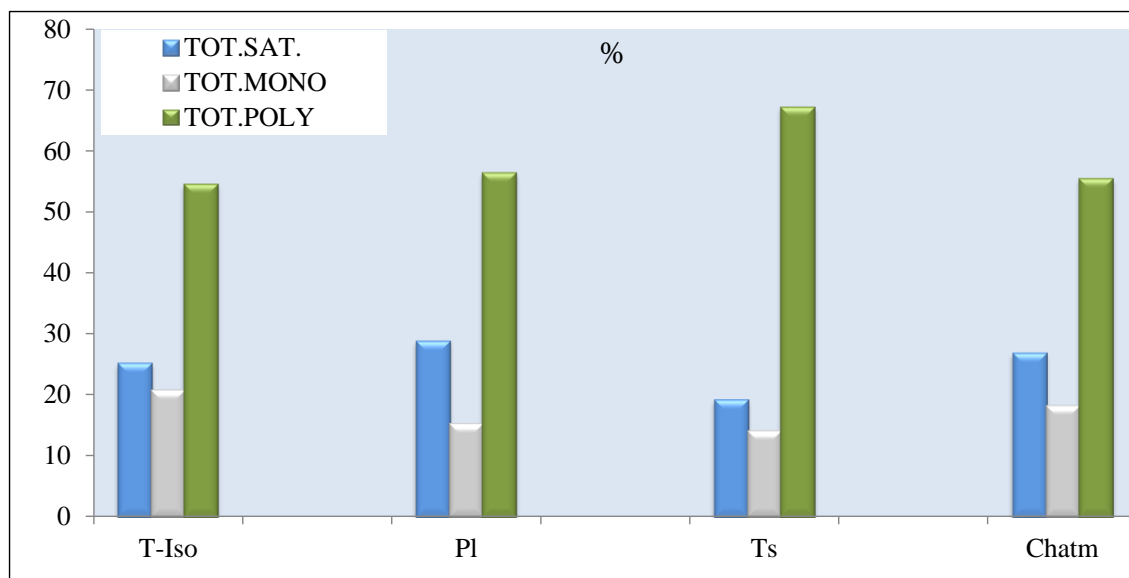


Figura 36.- Composición en porcentajes de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en los lípidos totales de las especies de fitoplancton cultivadas en el sistema Continuo bajo las condiciones óptimas definidas. *Isochrysis galbana/T-Iso* (T-Iso); *Pavlova lutheri* (Pl); *Tetraselmis suecica* (Ts) y *Chaetoceros muelleri* (Chatm).

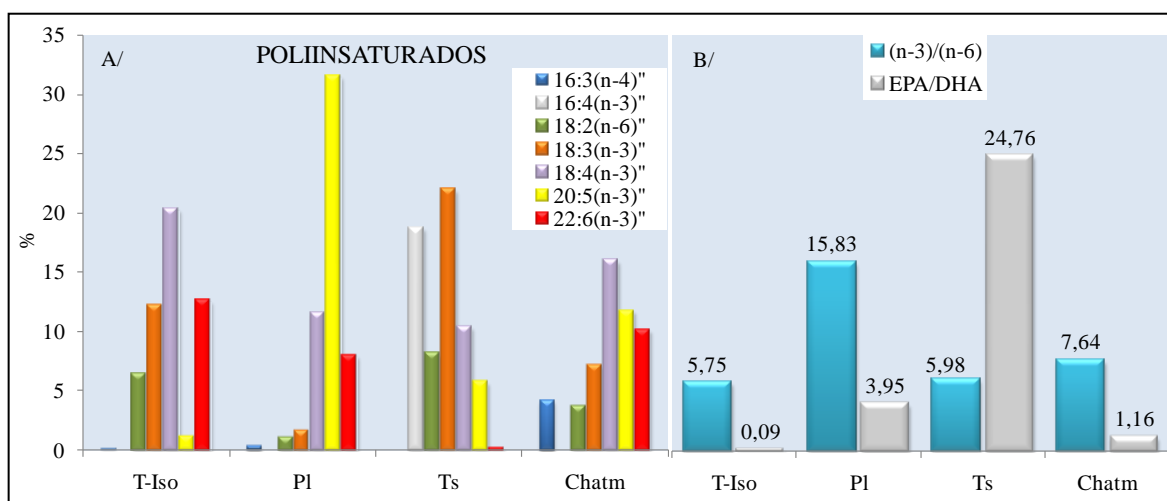


Figura 37.- A/. Composición en porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados más importantes en los lípidos totales de las especies de fitoplancton cultivadas en el sistema Continuo bajo las condiciones óptimas definidas. B/. Relaciones entre los ácidos grasos ω 3 y ω 6 y entre el 20:5n-3 (EPA) y el 22:6n-3 (DHA). *Isochrysis galbana/T-Iso* (T-Iso); *Pavlova lutheri* (Pl); *Tetraselmis suecica* (Ts) y *Chaetoceros muelleri* (Chatm).

En la composición de los ácidos grasos, todas las especies presentan mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (Figura 36). Los saturados más abundantes son: 14:0, 16:0 y 18:0; los monoinsaturados más representativos son: 16:1n7, 18:1n9, 18:1n7 y los poliinsaturados, de cada especie, se muestran en la figura 37 en donde se muestran también, las relaciones ω 3/ ω 6 y EPA/DHA. Los perfiles de este grupo de ácidos grasos, son los esperados según la bibliografía. Destaca, sobretodo, las diferencias que existen en el 20:5n-3 (EPA) y el 22:6n-3

(DHA) que provoca, a su vez, relaciones $\omega3/\omega6$ y EPA/DHA también muy dispares entre las especies estudiadas.

2.4.1.2.3. Pruebas de alimentación en los cultivos larvarios

Comparación de la alimentación de las larvas con fitoplancton cultivado en diferentes sistemas

Se realizaron tres experiencias en las que se comparó el fitoplancton producido en matraces de 6 L con el producido en bolsas de 35 L en cultivo cerrado.

La primera experiencia se eliminó porque con los resultados obtenidos no fue posible evaluar la supervivencia con los dos tipos de dietas.

En la segunda experiencia los crecimientos son mayores para las larvas alimentadas con matraces, aunque al final del cultivo, se igualan las tallas. La supervivencia fue mayor en las larvas alimentadas con fitoplancton de bolsa, ya que hubo una proliferación inesperada de ciliados en las alimentadas con el fitoplancton procedente de matraz y ello provocó una mortalidad importante en las larvas.

En la tercera experiencia, se observó que el crecimiento conseguido con el fitoplancton procedente de matraz es sensiblemente superior ($246 \pm 20,84 \mu\text{m}$) al logrado con el alimento de bolsa ($226 \pm 10,63 \mu\text{m}$), precisando estas últimas de 7 días más (34 días) para alcanzar la misma talla que las anteriores. La supervivencia final resultó igualmente superior en los tanques en que se utilizó alimento de matraz (35,6%) frente al de bolsa (26,2%).

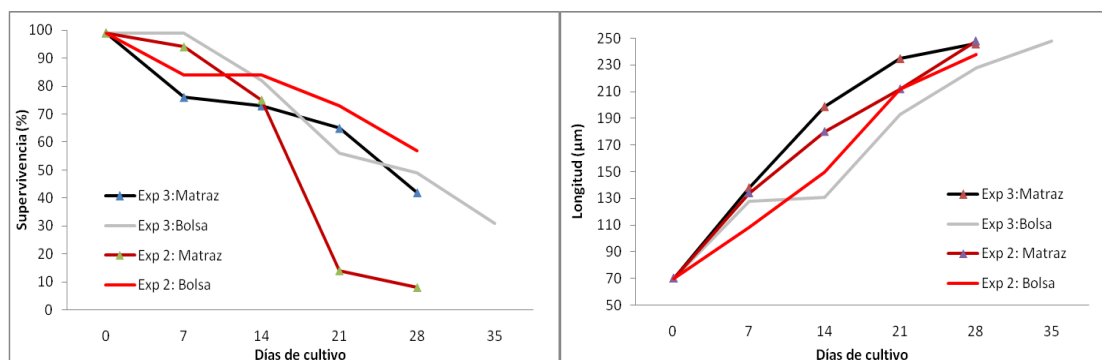


Figura 38.- Crecimiento y supervivencia durante los días de cultivo de las dos experiencias de cultivo larvario alimentadas con bolsa y matraz.

Se realizó otra experiencia comparando el efecto de la alimentación en el cultivo larvario con microalgas cultivadas en dos sistemas diferentes: cultivo a pequeña escala en una cámara isoterma (matraces de 6 L) y cultivo a gran escala en un sistema de producción en continuo (bolsas de 400 L). Se observó que el crecimiento es similar, aunque siempre existe una mayor supervivencia en las

larvas alimentadas con fitoplancton cultivado en el sistema continuo, frente a las alimentadas con el de cámara (Tabla XXI).

Tabla XXI.- Condiciones de cultivo y supervivencia de los tanques

TANQUE	CONDICIONES	SUPERVIVENCIA (%)
1	Comida del continuo	72,58
2	Comida de cámara	25,58
3	Comida del continuo	55,30

De estas experiencias no se pueden obtener resultados muy concluyentes ya que son estudios preliminares, lo que sí se puede concluir es que los diferentes sistemas de cultivo de fitoplancton hace que los resultados de los cultivos larvarios sean también distintos. Los diferentes sistemas de producción de fitoplancton dan como resultado microalgas con distinta calidad nutritiva y microbiológica y estas diferencias no son sólo a nivel de sistema de producción, sino también dentro de las diferentes instalaciones. Cada criadero debe tener el control de la calidad del fitoplancton en los diferentes sistemas que empleen.

Comparación de cuatro dietas diferentes

En la figura 39 se representa la composición bioquímica de las dietas comparadas, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de lípidos totales. La dieta 3 es la que presenta mayor cantidad, mientras que la dieta 4 es la que contiene menos lípidos totales.

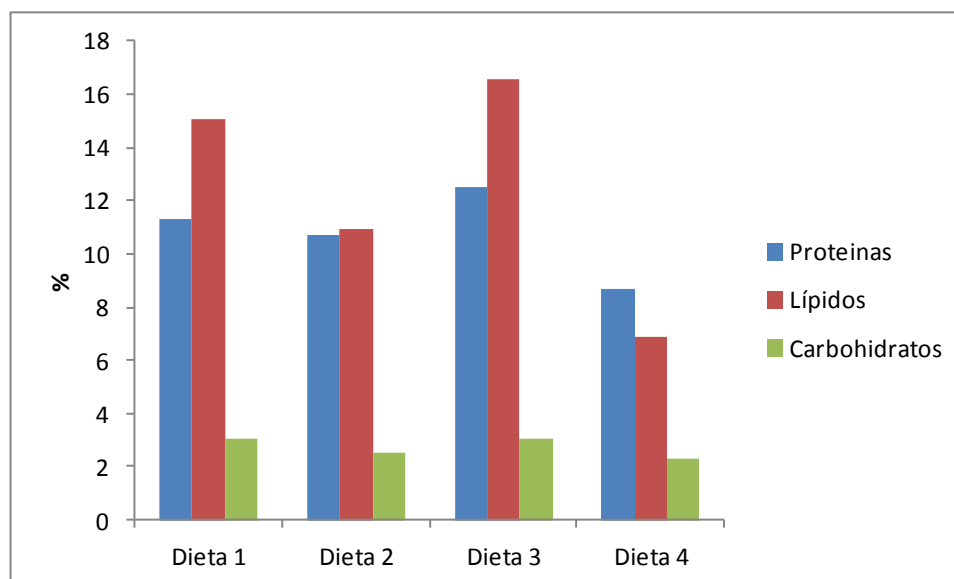


Figura 39.- Composición bioquímica de las dietas ensayadas.

En la composición bioquímica de las larvas pediveliger se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido en proteínas y lípidos totales (Figura 39).

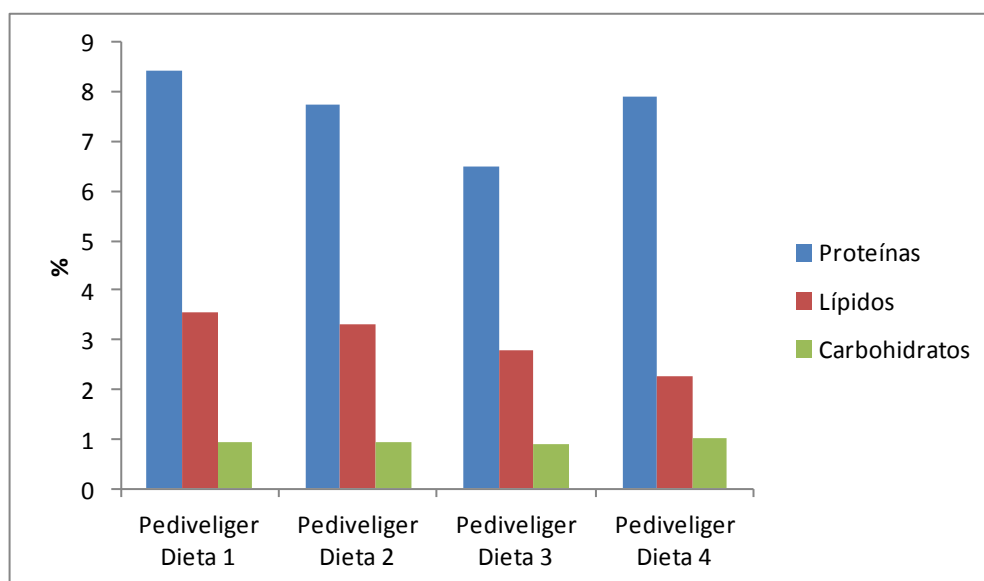


Figura 40.- Composición bioquímica de larvas pediveliger de 22 días.

Tabla XXII.- Datos de la composición (en porcentaje) de ácidos grasos en las fracciones de lípidos neutros y polares, de las familias de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, de los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios así como, las relaciones entre $\omega 3/\omega 6$ y EPA/DHA obtenidos en las dietas (1, 2, 3 y 4) utilizadas como alimento en el experimento y en las larvas tanto en el inicio (larva D) como a los 24 días (larvas alimentadas durante 22 días).

	ALIMENTO				LVD		LV a los 24 Días							
	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3	DIETA 4			DIETA 1		DIETA 2		DIETA 3		DIETA 4	
	Is/Mn/Cht 1:1	Is/Mn/Cht 1:2	Is/Mn 1:1	Cht 1			Is/Mn/Cht 1:1:1	LP	Is/Mn/Cht 1:1:2	LP	Is/Mn 1:1	LP	Cht 1	LP
16:3(n-4)	1,8	4,5	0,1	5,2	0,0 ± 0,000	0,0 ± 0,000	1,1 ± 0,000	0,0 ± 0,000	1,6 ± 0,080	0,0 ± 0,000	0,0 ± 0,001	0,0 ± 0,000	↑3,0 ± 0,046	0,0 ± 0,000
18:2(n-6) *	3,6	2,2	3,0	1,1	5,1 ± 0,033	0,5 ± 0,044	↓2,5 ± 0,001	0,4 ± 0,008	↓2,3 ± 0,044	0,4 ± 0,105	↓3,0 ± 0,007	0,5 ± 0,016	1,6 ± 0,007	0,5 ± 0,032
18:3(n-3)*	4,7	2,2	4,4	0,0	0,0 ± 0,000	1,0 ± 0,879	↑2,9 ± 0,001	↑2,0 ± 0,825	↑2,1 ± 0,037	↑1,7 ± 0,869	↑4,3 ± 0,036	↑2,2 ± 0,642	0,0 ± 0,000	0,7 ± 0,307
18:4(n-3)	12,2	6,9	13,1	0,9	1,3 ± 0,001	0,8 ± 0,042	↑7,6 ± 0,089	1,0 ± 0,048	↑5,4 ± 0,167	0,7 ± 0,190	↑10,8 ± 0,093	1,5 ± 0,034	0,6 ± 0,097	0,0 ± 0,000
20:4(n-6) ARA	1,1	1,2	0,3	2,9	0,7 ± 0,008	2,5 ± 0,056	2,0 ± 0,003	2,7 ± 0,235	2,3 ± 0,016	3,1 ± 0,271	0,7 ± 0,005	1,7 ± 0,054	4,0 ± 0,086	5,6 ± 0,043
20:5(n-3) EPA *	11,4	11,8	10,9	13,2	5,7 ± 0,020	14,0 ± 0,055	↑19,1 ± 0,085	10,0 ± 0,617	↑16,7 ± 0,435	10,2 ± 0,997	↑13,6 ± 0,001	9,0 ± 0,428	↑18,7 ± 0,494	↑17,1 ± 0,212
22:6(n-3) DHA*	6,6	3,6	6,9	1,2	3,4 ± 0,000	16,7 ± 0,171	↑8,0 ± 0,042	↑18,3 ± 1,472	↑5,9 ± 0,112	↑16,9 ± 1,771	↑9,5 ± 0,005	↑22,5 ± 0,804	1,5 ± 0,139	8,7 ± 0,178
TOT.SAT.	32,9	38,8	36,0	40,1	39,2 ± 0,076	25,2 ± 1,730	27,9 ± 0,033	26,5 ± 0,983	32,9 ± 0,631	27,4 ± 1,915	31,0 ± 0,050	27,3 ± 1,392	36,6 ± 1,500	24,6 ± 0,492
TOT.MONO	19,3	22,9	21,1	23,4	33,8 ± 0,101	8,1 ± 0,181	19,3 ± 0,050	6,8 ± 0,143	21,8 ± 0,278	6,6 ± 1,579	18,4 ± 0,019	7,1 ± 0,286	26,2 ± 0,798	8,7 ± 0,198
TOT.POLY	47,8	38,2	42,8	32,2	17,1 ± 0,067	39,0 ± 2,030	46,6 ± 0,242	40,6 ± 4,131	39,5 ± 0,961	37,5 ± 5,720	45,1 ± 0,181	43,7 ± 2,578	31,7 ± 1,263	34,6 ± 0,805
20:5/22:6	1,7	3,3	1,6	10,8	1,7 ± 0,000	0,8 ± 0,000	2,4	0,5	2,8	0,6	1,4	0,4	↑12,2	2,0
(n-3)/(n-6)	4,9	4,6	7,7	1,9	1,6 ± 0,000	5,0 ± 0,000	↑5,6	3,4	↑4,6	3,8	↑6,1	4,1	3,3	3,3
TOTAL					63,8 ± 0,433	36,2 ± 0,433	64,8 ± 0,618	35,2 ± 0,618	53,3 ± 3,347	46,7 ± 3,347	70,0 ± 0,033	30,0 ± 0,033	56,8 ± 0,564	43,2 ± 0,564

Según los resultados anteriores (Tabla XXII) las dietas 1, 2 y 3 formadas por tres y dos microalgas (*Isochrysis*, *Monochrysis* y *Chaetoceros*) presentan como ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios el 18:2(n-6), el 18:3(n-3), el 18:4(n-3), el EPA (20:5(n-3)) y el DHA (22:6(n-3)) con valores aproximados a un 2-3%, 2-4%, 7-13%, 11% y 3-7%, respectivamente. La relación $\omega 3/\omega 6$ es bastante alta puesto que, en las dietas 1 y 2 asciende a 5 y en la dieta 3 llega hasta 7,5; por otra parte, la relación EPA/DHA es baja de 1,5-3. Las larvas alimentadas con estas tres dietas durante los 22 días de la experiencia, muestran este mismo perfil de ácidos grasos, pero cabe destacar dos aspectos importantes. El primero es que, todos estos ácidos grasos se almacenan en los lípidos neutros o de reserva de las larvas, excepto el 18:2(n-6), que disminuye su porcentaje con relación a la larva D (origen del experimento); así mismo, la relación alta de $\omega 3/\omega 6$, también se refleja en las reservas, sobretodo, en las que fueron alimentadas con la dieta 3. En el caso del 18:3(n-3) y del DHA, las larvas alimentadas con estas dietas presentan un aumento en sus porcentajes, tanto en las reservas como en las estructuras, aunque el primero es más acusado en los lípidos neutros y el segundo, en los polares. El segundo aspecto a destacar es que, la diferencia de porcentajes entre lípidos neutros y polares, en las larvas cultivadas con la dieta 3, es muy acusada (70% en LN y 30% en LP).

La dieta 4 compuesta por una sola microalga (*Chaetoceros*), aporta mayoritariamente el 16:3(n-4) y el EPA (5,2% y 13,2%, respectivamente); proporciona una relación $\omega 3/\omega 6$ baja (1,9) con relación a las otras dietas estudiadas pero, sin embargo, su relación EPA/DHA es la más alta (10,8). Esta composición se ve reflejada en las larvas alimentadas con ella puesto que, ambos ácidos grasos, están acumulados en la fracción de lípidos neutros (3% y 18,7%, respectivamente) aunque el EPA, también presenta un acúmulo en los lípidos polares que no es tan acusado (17,1%) por partir de cantidades altas en larvas D (14%). El efecto que tiene esta dieta sobre la relación EPA/DHA en las larvas es de aumentarla sobretodo y, nuevamente, en las reservas (12,2) además, la relación $\omega 3/\omega 6$ tiene el mismo valor en ambas fracciones (3,3).

En la figura 41 se observa el efecto de las cuatro dietas ensayadas sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas a lo largo del cultivo. A partir de los primeros 8 días de cultivo y hasta el final de la prueba, las tasas de crecimiento son diferentes significativamente ($p < 0.05$) con las cuatro dietas ensayadas. Las larvas alimentadas con la dieta 3 son las que menos crecen, alcanzando una talla de $201 \pm 10 \mu\text{m}$ a los 22 días de cultivo, mientras que las larvas alimentadas sólo con *C. muelleri* (dieta 4), son las que mayor talla alcanzan cuando llegan a pediveliger ($230 \pm 14 \mu\text{m}$). Mientras que la supervivencia durante toda la experiencia fue similar en las tres dietas que contienen *C. muelleri*, la dieta 3 (*I. galbana* y *P. lutheri*) presentó valores más bajos, siendo diferentes significativamente ($p < 0.05$) a partir del día 18.

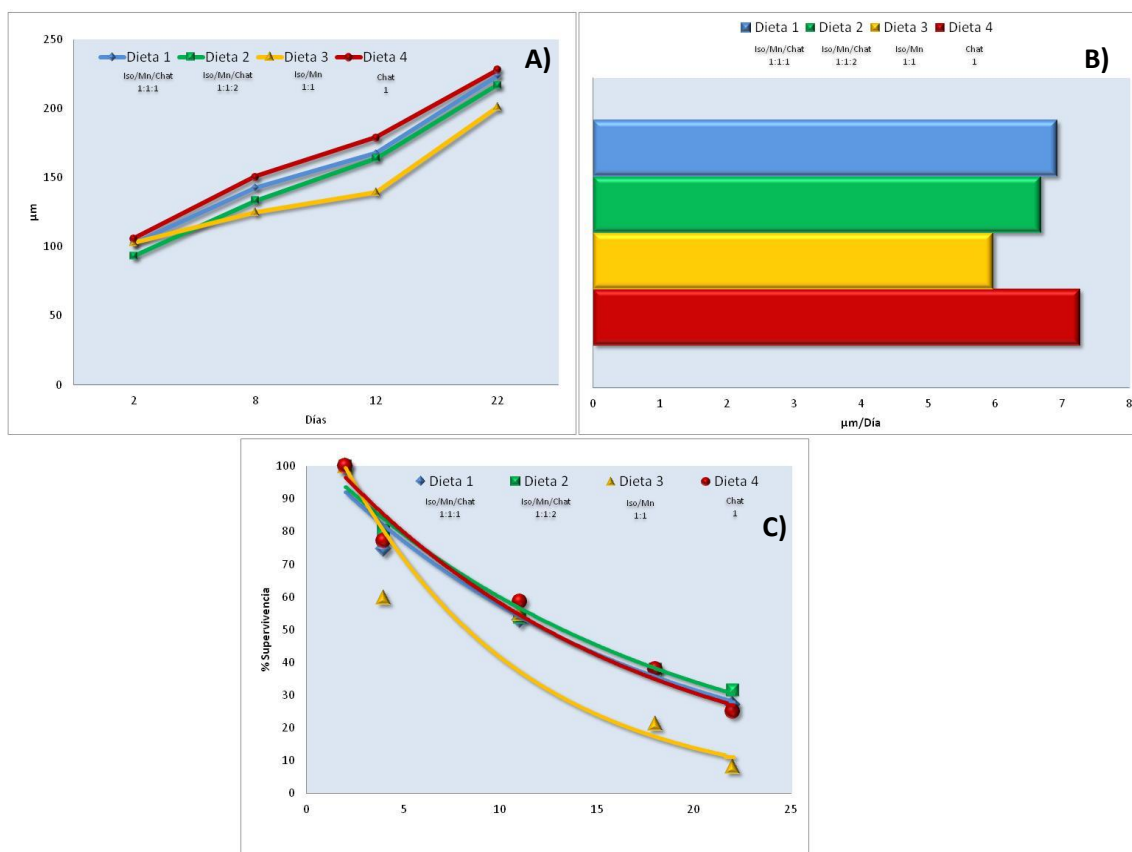


Figura 41.- Representación del efecto de las cuatro dietas: A). En el crecimiento (μm) de las larvas a lo largo de la prueba (22 días); B). En la tasa de crecimiento de las larvas durante el cultivo ($\mu\text{m}/\text{día}$) y C). Porcentaje de supervivencia.

Así pues, los mejores resultados se obtienen con la dieta 4 que incorporaba solamente *Chaetoceros* y los peores con la dieta 3, que proporcionaba *Isochrysis* y *Monochrysis*. Las dietas 1 y 2 no tienen un mal comportamiento y es parecido al de la dieta 4 pero, en este caso, se emplean las tres especies.

Por lo tanto, una dieta constituida por una sola especie (*Chaetoceros*), con una proporción de EPA alto en relación al DHA y una proporción $\omega 3/\omega 6$ de 1,9 consigue mejores resultados de crecimiento y supervivencia que otra dieta que aporta *Isochrysis* y *Monochrysis*, con la consiguiente disminución de EPA y aumento de la relación $\omega 3/\omega 6$ (7,7). Esta última dieta parece que lo que consigue es acumular reservas en las larvas en vez de crecer, lo que las convierte en grasas, como sugiere Nóvoa (2007) en relación a la vieira.

En cualquier caso, es evidente la necesidad del aporte de *Chaetoceros* a la dieta en el cultivo larvario de esta especie puesto que, las otras dos dietas estudiadas (que la incorporan) también suponen unos buenos resultados en los cultivos. Estaríamos pues, ante la posibilidad de utilizar una dieta monoalgal con los mismos resultados o mejores, que una dieta basada en una mezcla de diferentes microalgas.

Efecto del ayuno en los primeros días del cultivo larvario

Se observan diferencias en crecimiento entre todos los grupos, siendo más acusadas a partir de la primera semana de cultivo. Las larvas que estuvieron dos y cuatro días sin comer, son las que más se acercan a la talla alcanzada por el grupo control. Por el contrario, las larvas que estuvieron los seis primeros días sin comer, presentan tallas muy por debajo de lo encontrado con las larvas control (Fig. 42).

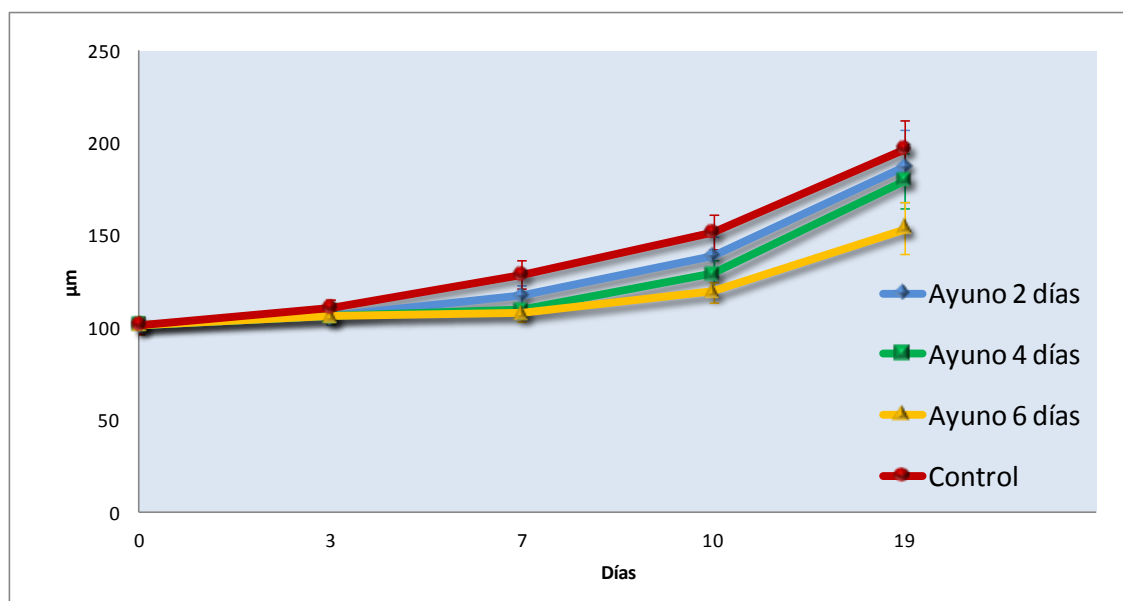


Figura 42.- Crecimiento larvario en longitud durante el desarrollo larvario de cada uno de los grupos ensayados

Teniendo en cuenta la supervivencia obtenida con cada grupo hasta pediveliger, vemos que no hay diferencias significativas entre las larvas alimentadas desde el primer día y las que estuvieron algún tiempo en ayuno (Fig. 43). Los dos momentos del desarrollo larvario más afectados por altas mortalidades son las larvas recién transformadas a larva D y las larvas que se disponen a realizar la metamorfosis a postlarvas, sin que se observen diferencias significativas entre las larvas alimentadas y las que estuvieron en un régimen de ayuno.

Si analizamos la evolución bioquímica del grupo control, podemos marcar un patrón de cómo se van consumiendo y acumulando los componentes bioquímicos a lo largo de los primeros días del desarrollo larvario (Fig. 44). En base a ello, observamos que en las larvas alimentadas desde el primer día, las proteínas tienden a disminuir durante los seis primeros días para, a día trece, recuperar el contenido hasta los valores iniciales. Con los lípidos totales pasa algo parecido, disminuyen hasta el día seis, siendo más acusada la caída hasta el día cuatro. A partir de este momento, los lípidos recuperan su cantidad pero sin llegar a los valores iniciales. Sin embargo, los carbohidratos tienden a bajar durante los cuatro primeros días sin mostrar después una recuperación de esos valores y manteniéndose bajo hasta el día trece (Fig. 44). Es decir, en las larvas que

comieron desde el primer día, se observó que las proteínas y los lípidos totales son las fracciones bioquímicas que más se consumen durante los primeros días de desarrollo larvario.

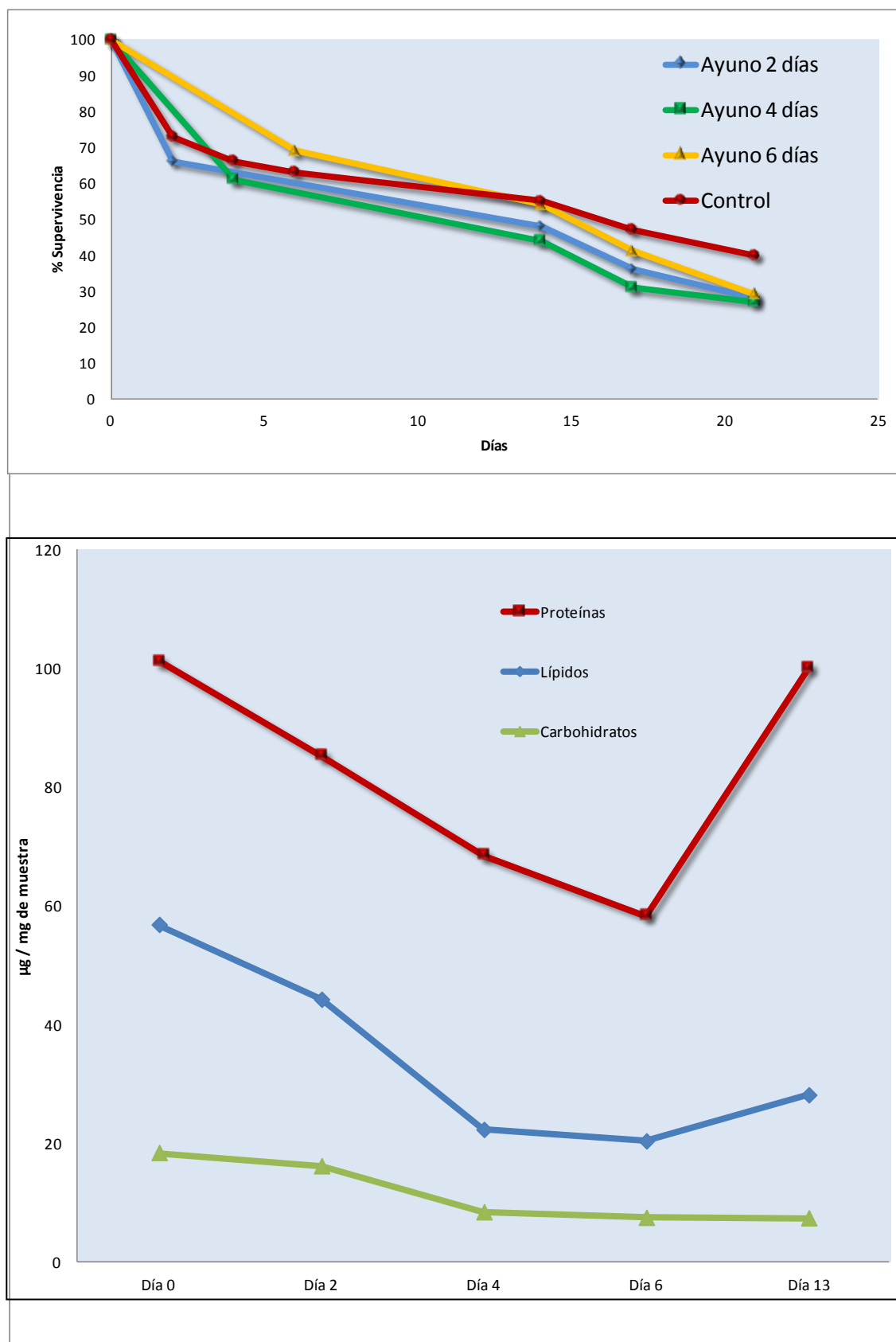


Figura 44.- Evolución bioquímica durante los 13 primeros días del grupo control.

Una vez que tenemos estudiado cómo es el perfil bioquímico del grupo control a lo largo de los trece primeros días del desarrollo larvario, si comparamos con los tres grupos que fueron sometidos a diferentes regímenes de ayuno, podemos entender cómo el ayuno aumenta el consumo de estos componentes bioquímicos almacenados en las larvas, y cómo después de iniciar la alimentación exógena, éstos recuperan o no (Fig. 45,46 y 47).

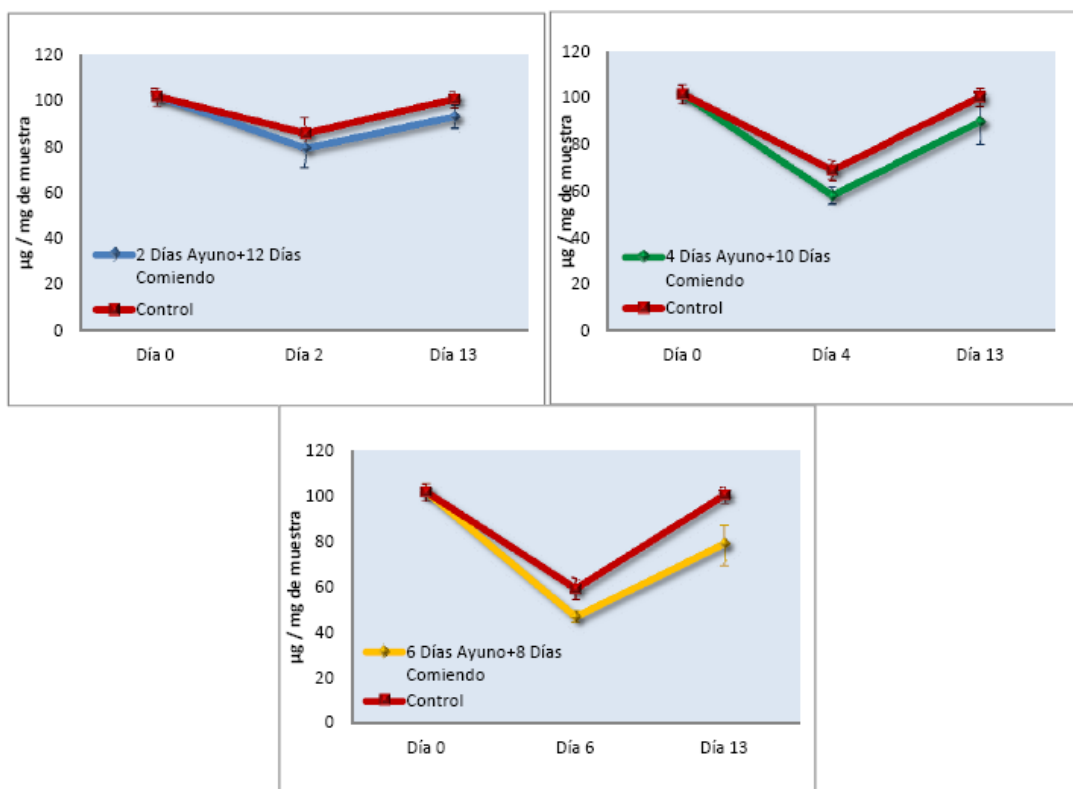


Figura 45.- Evolución de los niveles de proteínas a lo largo de desarrollo larvario. Comparación del grupo control con cada uno de los grupos de ayuno ensayados.

Dentro de las proteínas, observamos cómo el grupo de ayuno de 2 días son las que menos pierden en relación al control, y además son las que mejor recuperan el contenido de proteínas, una vez que se inicia la alimentación exógena. Por el contrario, el grupo que permaneció 6 días de ayuno, es el que más pierde comparado con el control y ello supone que tras iniciar la alimentación no recuperen su contenido, quedando lejos de los valores mostrados por las larvas que se alimentaron desde el primer día (Fig. 45) y reflejándose en un menor crecimiento (Fig. 42).

En cuanto a los lípidos totales, es la fracción bioquímica que menos se ve afectada por el ayuno, mostrando que el consumo es prácticamente igual que en el control, y que tras comenzar la alimentación, la recuperación es bastante buena, llegando a los valores mostrados por el grupo control (Fig. 46).

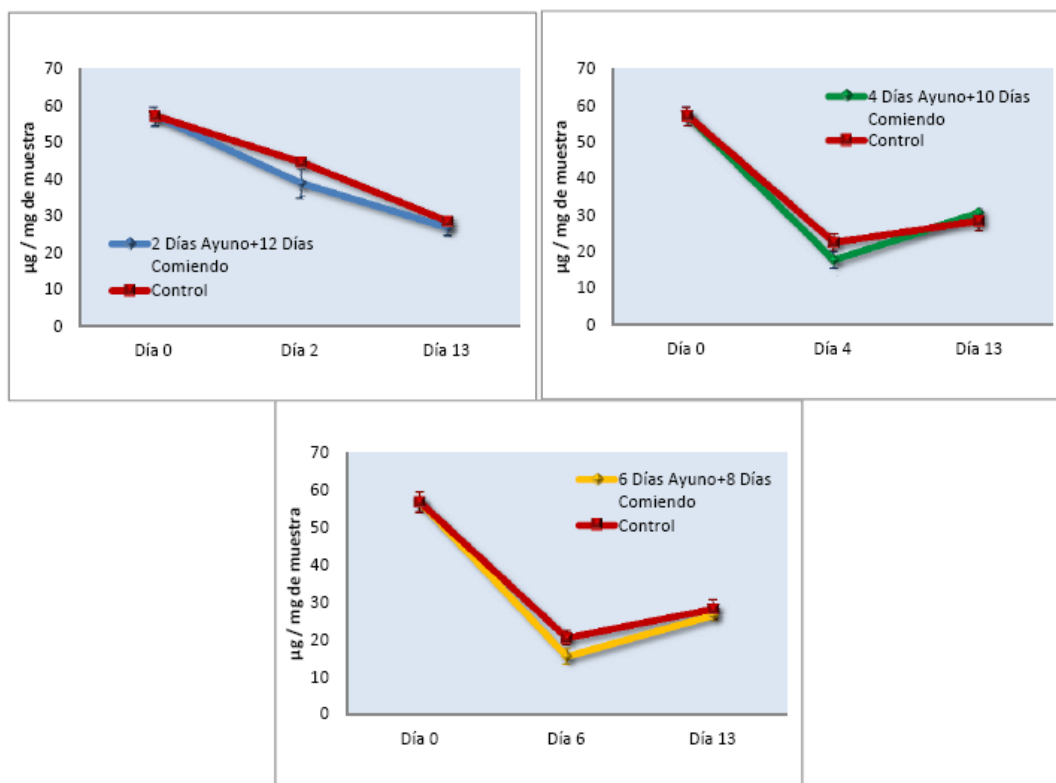


Figura 46.- Evolución de los niveles de lípidos totales a lo largo del desarrollo larvario. Comparación del grupo control con cada uno de los grupos de ayuno ensayados.

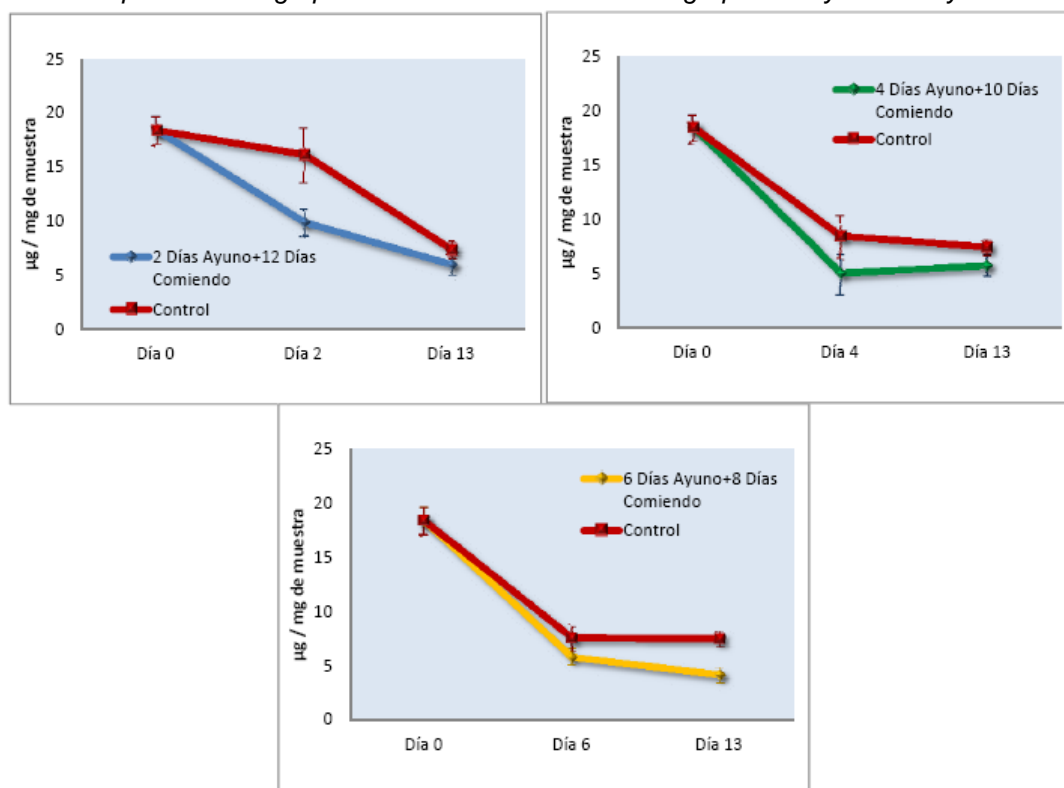


Figura 47.- Evolución de los niveles de carbohidratos a lo largo del desarrollo larvario. Comparación del grupo control con cada uno de los grupos de ayuno ensayados.

Cuando analizamos el contenido en carbohidratos de los tres grupos de ayuno ensayados, y lo comparamos con el grupo control, observamos que el ayuno durante los dos primeros días, provoca un descenso brusco de los carbohidratos. Esto nos lleva a pensar que en condiciones de ayuno, la primera fuente energética que se consume son los carbohidratos. Sin embargo, cuando analizamos la recuperación del contenido en carbohidratos, una vez que se ha iniciado la alimentación, el grupo que estuvo dos días en ayuno, alcanza valores similares a los encontrados en el grupo control, y son las larvas que estuvieron seis días en ayuno, las que peor recuperan (Fig. 47).

En resumen, lo mejor es que las larvas de almeja fina coman desde el primer día, pero en caso de necesidad, son capaces de soportar el ayuno durante los cuatro primeros días del desarrollo larvario, sin que ello suponga un agravio para el cultivo, y pudiendo recuperar su condición una vez que se inicie la alimentación. Sin embargo, mantenerlas seis o más días sin comer, provoca que no sean capaces de recuperar su condición cuando se inicia la alimentación, y ello compromete el rendimiento del cultivo.

Comparación de diferentes dietas a partir de la segunda semana de cultivo

Como se observa en la siguiente tabla, los mejores resultados se obtuvieron con la dieta basada en *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros* sp. Se observó un mayor rendimiento en el crecimiento del cultivo, así como una mayor supervivencia de las larvas alimentadas con esta dieta.

En realidad consideramos que lo ideal es una dieta rica y variada, teniendo como base de ella estas dos especies, por su perfil bioquímico y composición de ácidos grasos.

Tabla XXIII.- Resultados de los cultivos en los que se compararon dos dietas diferentes a partir de la segunda semana de cultivo. L (lunes), X (miércoles), V (viernes).

Larvas (M)	Superviv	Densidad (larv/ml)	Talla fijación	Tanque	Tipo	Material	Renovación	Tª	Alimentación
7,2	31,94	5	233,1	500 L	Tronco- cónico	Fibra	L-X-V	17°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch + Ts + Ph
7,7	15,58	5	226,1	500 L	Tronco- cónico	Fibra	L-X-V	18°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch + Ts + Ph
3,95	0	5		350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	19°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch + Ts + Ph
6,78	0	5		350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	19°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch + Ts + Ph
6,16	0	5		350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	17°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch + Ts + Ph
17,6	56,25	5	239,8	500 L	Tronco- cónico	Fibra	L-X-V	18°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
15,2	67,02	7,5	238,2	350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	18°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
9,78	54,25	7,5	226,3	350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	18°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
12,73	0	7,5		350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	18°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
14,68	1,8	5	226,7	350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	17°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
21,51	0	5		350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	17°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
2,55	17,7	5	194,5	350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	17°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch
8,66	6,9	5	202,1	350 L	Tronco- cónico	Polietileno blanco	L-X-V	19°C	1ª Semana Iso- 2ª Iso + Ch

Estudio de la tasa de ingestión en función de la concentración del alimento suministrado

Según los resultados obtenidos, no observamos diferencia en cuanto a tasa de ingestión en los tres tratamientos estudiados. La primera semana (Figura 48), el consumo de fitoplancton varía entre las 2.000 y 4.000 células por larva al día. La segunda semana de cultivo la tasa aumenta, rondando las 6.000 células de consumo diario. En la tercera semana la tasa de ingestión muestra los valores más altos de todo el cultivo, situándose en torno a las 7.000 células al día. La cuarta y última semana, cuando las larvas comienzan a prepararse para la fijación, el consumo disminuye, obteniéndose valores en torno a las 5.000 células, inferiores incluso a los obtenidos a las dos semanas de cultivo.

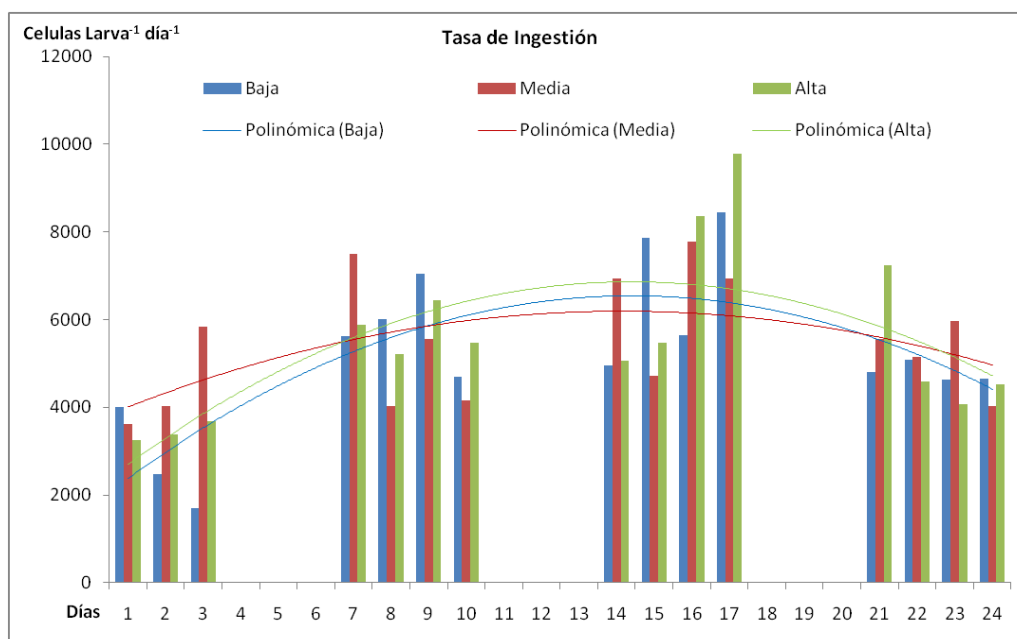


Figura 48: Tasa de ingestión: Células de fitoplancton consumido por larva al día durante los días de cultivo larvario en función de la concentración de fitoplancton suministrado.

Las supervivencias obtenidas (Figura 49) en los tratamientos a baja, media y alta concentración fueron del 89%, 84% y 75% respectivamente, muy elevadas en los tres casos y sin diferencias significativas entre ellas. En cuanto al crecimiento (Figura 49), se observa que siguen el mismo patrón, y la longitud es similar para los tres tratamientos hasta alcanzar la talla de fijación con 240-250 μm a los 25 días de cultivo.

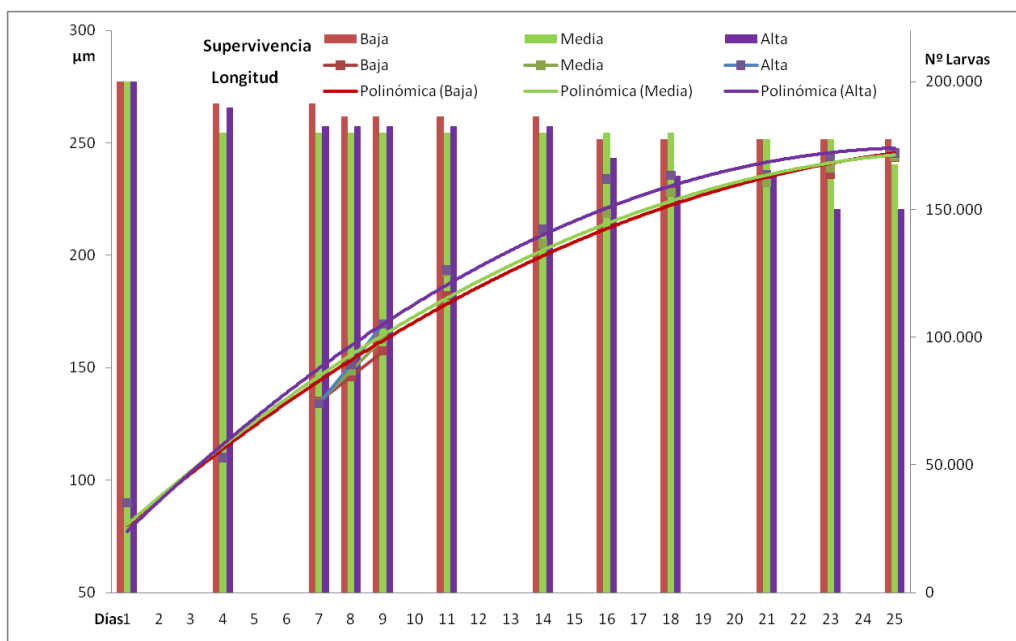


Figura 49.- Supervivencia y crecimiento larvario según la concentración de alimento suministrado.

Una vez las larvas alcanzaron la etapa de pediveliger, con 240-250 µm de longitud, se concluyó el cultivo larvario y se pasaron a tamices de fijación para que completaran la metamorfosis. Las larvas de cada tanque se depositaron en un tamiz de fijación que se colocaron en un tanque de 1.000 L con un aporte inicial de alimento de 80 células/µL.

Transcurrieron aproximadamente 50 días desde el inicio de la fijación hasta que toda semilla quedó retenida en tamiz de 300 µm. En este tiempo, a pesar de realizarse el preengorde en las mismas condiciones, se observan diferencias en cuanto a crecimiento y supervivencia de la semilla en función de la concentración de alimento que se les suministró en la etapa larvaria (Figura 50). Los resultados más bajos se obtuvieron en la semilla que fue alimentada a baja concentración en etapa larvaria, con una supervivencia del 33% y una talla media de $1,72 \pm 0,52$ mm. En cuanto a la semilla procedente de los otros dos tratamientos, la supervivencia fue del 81% y 91% y la talla final de $1,86 \pm 0,46$ mm y $1,93 \pm 0,46$ mm, según se tratase de concentración media y alta, respectivamente.

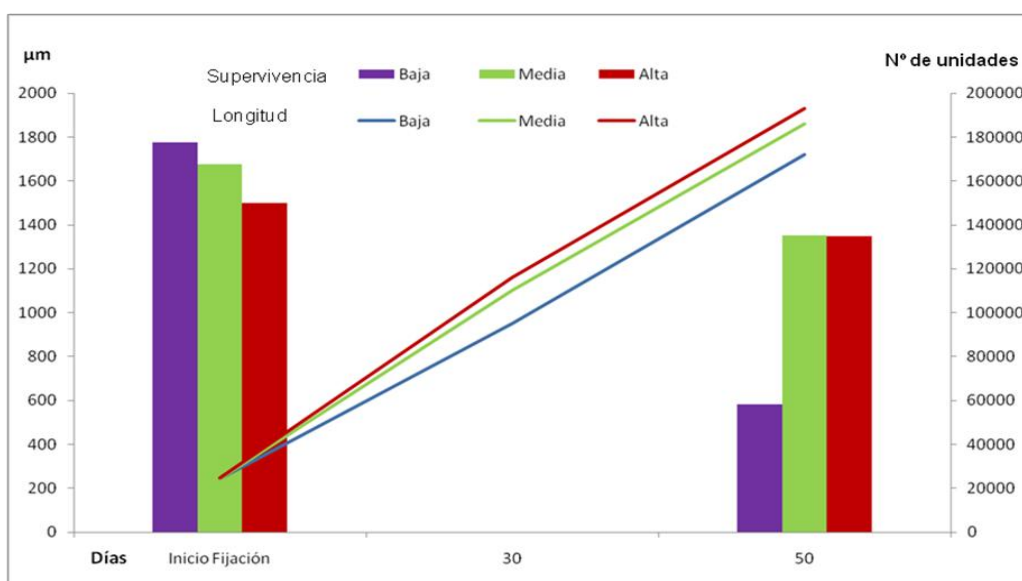


Figura 50.- Supervivencia y crecimiento, desde el inicio de la fijación hasta que la semilla queda retenida en tamiz de 300 µm, en función de la concentración de alimento suministrado en la etapa larvaria.

2.4.1.2.4. Composición bioquímica de las larvas

La composición bioquímica de las larvas D y de larvas de 14 días, se muestra en la tabla XXIV.

Tabla XXIV.- Datos en porcentaje de la composición bioquímica de las larvas D y de larvas de 14 días obtenidas de progenitores de distinto origen: Cataluña (CAT), Galicia (GAL), Murcia (MUR) y Huelva (HUEL). En el caso de las larvas de progenitores de Huelva, los datos corresponden a la media obtenida de la composición de todas las larvas obtenidas en distintas puestas.

Puesta	Larva D			Larva 14 Días		
	% LIP	% CH	% PROT	% LIP	% CH	% PROT
CAT 11-5-10	8,83	0,33	12,77	-	-	-
CAT 07-7-10	2,71	1,06	6,09	5,95	1,04	65,48
GAL 11-5-10	4,37	0,22	34,08	3,4	0,66	7,72
GAL 25-5-10	8,69	0,56	13,72	-	-	-
MUR 25-5-10	-	-	-	-	-	-
MUR 15-6-10	4,88	0,95	15,53	3,59	1,62	47,18
MUR 28-7-10	5,56	1,17	7,18	3,02	1,38	45,52
HUEL (Media)	12,73	5,03	19,73	17,76	4,73	31,17

En las larvas D el componente mayoritario son las proteínas con valores desde el 6,09% y el 34,08%. Se observa cómo los valores de proteínas más altos que existían en los ovocitos de puestas de GAL 11-5-10 y de HUEL, conservan esta diferencia en las larvas con relación a las otras puestas. Los lípidos vuelven a ser el segundo componente en importancia con porcentajes desde 2,71% y 12,73%. En las larvas de 14 días, se vuelve a apreciar el mayor contenido en las proteínas (de 7,72% a 65,48%).

Tabla XXV.- Datos en porcentaje de principales grupos de ácidos grasos de las larvas D y larvas de 14 días obtenidas de progenitores de distinto origen: Cataluña (CAT), Galicia (GAL), Murcia (MUR) y Huelva (HUEL). En el caso de las larvas de progenitores de Huelva, los datos corresponden a la media obtenida de la composición de todas las larvas obtenidas en distintas puestas.

Puesta	Larva D				Larva 14 Días			
	% SAT	% MUFA	% PUFA $\omega 6$	% PUFA $\omega 3$	% SAT	% MUFA	% PUFA $\omega 6$	% PUFA $\omega 3$
CAT 11-5-10	22,22	48,44	11,33	15				
CAT 07-7-10	24,78	31,96	23,63	16,58	16,68	42,17	18,81	21,16
GAL 11-5-10	14,09	32,25	31,76	18,96	14,53	42,8	24,96	16,33
GAL 25-5-10	24,25	38,97	16,71	16,66				
MUR 25-5-10								
MUR 15-6-10	31,5	29,2	20,73	18,24	14,52	28,93	29,59	26,72
MUR 28-7-10	27,91	37,38	17,3	17,12	18,25	34,6	17,46	29,51
HUEL (Media)	62,16	12,52	5,37	7,14	38,09	17,96	7,99	15,84

Como se observa en la tabla anterior de *la composición en ácidos grasos de la larva D y larva de 14 días*, son los monoinsaturados (MUFA) los que presentan contenidos mayores (31,96% a 48,44%) a excepción de las larvas de HUEL y de MUR 15-6-10 (12,52% y 29,2%, respectivamente). Estos valores van seguidos de los obtenidos para los poliinsaturados ($\omega 6 + \omega 3$) y los saturados (SAT), llegan a ser muy importantes solamente en el caso de las larvas de Huelva (62,16% en larvas D y 38,09 en larvas de 14 días) en estas larvas también destacan los bajos valores de $\omega 6$ (5,37% y 7,99%, respectivamente) frente a los de $\omega 3$ (7,14% y 15,84%, respectivamente).

Tabla XXVI.- Datos en porcentaje de principales grupos de ácidos grasos de las postlarvas obtenidas de progenitores de distinto origen: Cataluña (CAT), Galicia (GAL), Murcia (MUR) y Huelva (HUEL). En el caso de las postlarvas de progenitores de Huelva, los datos corresponden a la media obtenida de la composición de todas las postlarvas obtenidas en distintas puestas.

Puesta	Postlarvas			
	% SAT	% MUFA	% ω 6 PUFA	% ω 3 PUFA
CAT 11-5-10	15,79	59,3	12,44	12,17
CAT 07-7-10	14,68	39,83	29,76	14,36
GAL 11-5-10				
GAL 25-5-10				
MUR 25-5-10				
MUR 15-6-10	19,34	51,31	10,16	18,99
MUR 28-7-10	19,62	38,61	19,3	22,24
HUEL (Media)	51,36	15,10	6,60	9

En las postlarvas (Tabla XXVI) se observa el mismo comportamiento que el visto en larvas D y larvas de 14 días, aumentando de forma considerable la cantidad de ácidos grasos saturados en las postlarvas cuyos progenitores eran de Huelva (51,36%).

Como en el caso de los ovocitos, a los datos obtenidos de todas las larvas cuyos progenitores eran de Huelva, se les efectuó un estudio más exhaustivo para determinar si existían diferencias significativas entre ellos, tanto a nivel de composición bioquímica como de ácidos grasos.

Comparando la composición bioquímica entre las larvas D de las distintas puestas conseguidas con los progenitores de Huelva (Figura 51), no hay diferencias significativas en carbohidratos (K-W, ANOVA; $p=0.159$), siendo significativas en lípidos y proteínas con un alto nivel de significación (ANOVA; $p=0.001$).

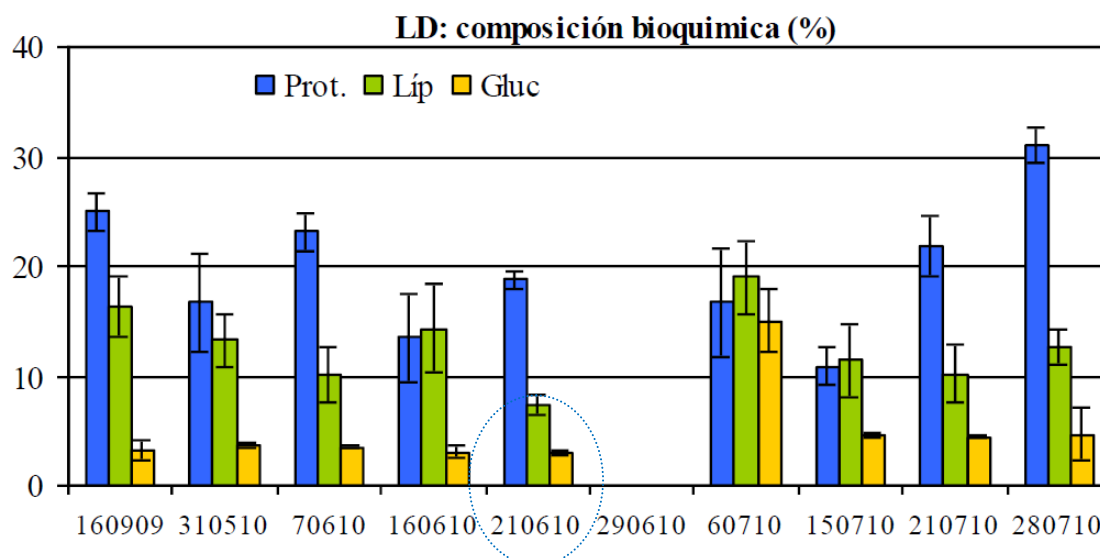


Figura 51.- Composición bioquímica de las larvas D (%) de las distintas puestas obtenidas con progenitores de Huelva.

Realizando un test *post-hoc* (Duncan), los grupos homogéneos que se establecen para los carbohidratos no tienen un patrón destacable, ya que están en el mismo grupo las larvas D de cultivos que han alcanzado resultados muy diferentes. Para los lípidos, sin embargo, existe una relación entre su alto contenido y la mayor supervivencia de los cultivos. Esto se ve reflejado en larvas D de puestas de individuos acondicionados del 16 de septiembre y del 6 de julio (con valores lipídicos del 16,36 y 18,98%, respectivamente), frente a larvas D de la puesta de individuos del medio natural del 21 de junio con sólo un 10,21% de composición lipídica.

En este caso igualmente, se observa cómo todas las larvas de 14 días, de estos mismos progenitores, son homogéneas en carbohidratos, pero muestran diferencias significativas en proteínas y en lípidos (ANOVA; $p=0.00734$).

Hasta ahora se ha observado cómo la cantidad de lípidos totales de estas larvas D (12,73%), antes del comienzo de alimentación exógena, muestra valores similares a los observados en los huevos (11,96%). Sin embargo, en las larvas ya alimentadas (larvas de 14 días), sí se aprecia un incremento a lo largo del cultivo antes de la metamorfosis que es significativamente superior en las puestas que llegaron hasta la metamorfosis frente a las que no (Figura 52).

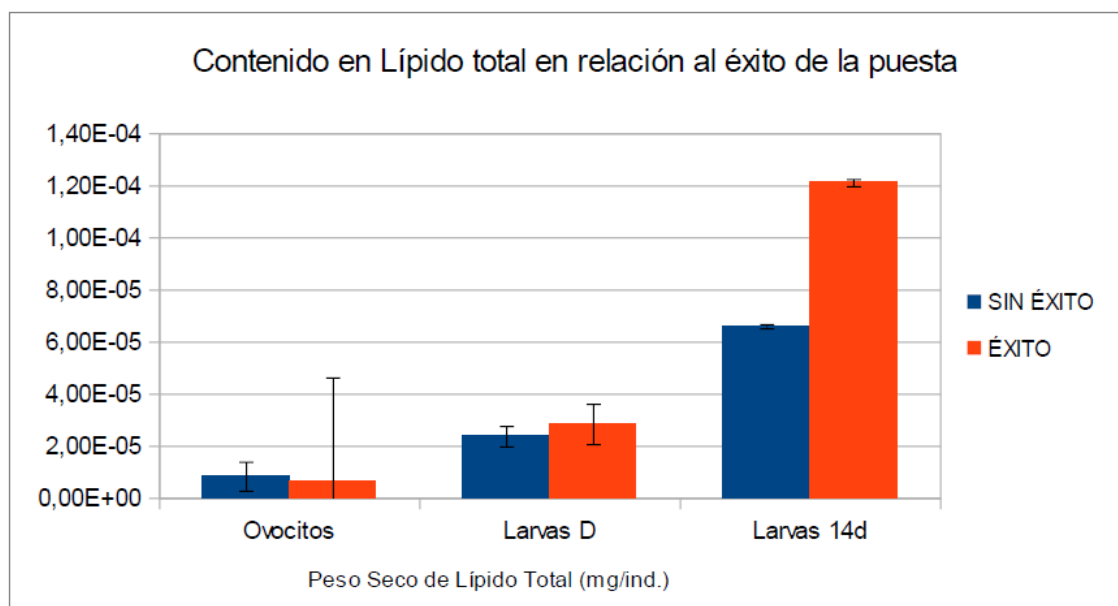


Figura 52.- Concentración media de Lípidos Totales de las distintas etapas de desarrollo en puestas que han alcanzado la metamorfosis (éxito) frente a las que no superaron el cultivo larvario (pertenecientes a los progenitores de Huelva).

Por lo tanto mientras que, el contenido en lípidos totales en los ovocitos emitidos por las hembras de Huelva varía entre las puestas, sin que se haya observado que esta diferencia esté relacionada con el éxito del cultivo larvario en la composición bioquímica de las larvas, podemos resaltar que las puestas con buenos resultados en supervivencia se han destacado por una mayor proporción de lípidos, sobre todo, en las larvas D.

Con relación al total de ácidos grasos en los lípidos totales de las larvas nacidas de progenitores de Huelva, respecto al peso seco, representa un $18,29 \pm 20,97\%$ en las larvas D (LD); $17,87 \pm 1,85\%$ en las larvas de 14 días (L14d) y $13,94 \pm 3,045$ en las postlarvas (PtLv), y su distribución en los principales grupos (saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, dimetil acetal, n-3, n-6, n-9 y n-3 HUFA) se muestra en la figura 53.

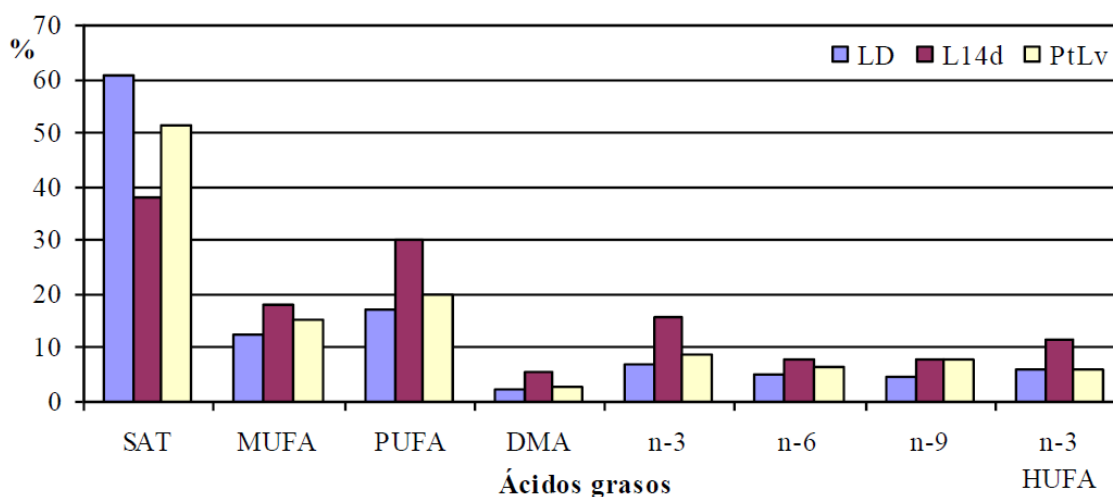


Figura 53.- Composición en ácidos grasos de las larvas de los progenitores de Huelva (% del total de ácidos grasos) según los grupos principales: saturados (SAT), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA), dimetilacetil (DMA), n3, n6, n9 y n-3HUFA.

Los ácidos grasos saturados más abundantes en los tres estadios son el 16:0 (22,74; 16,99 y 19,82%, respectivamente), y en menor medida el 18:0 (8,09; 7,29 y 8,85%, respectivamente) y el 14:0 (3,03; 5,89 y 4,5%, respectivamente).

En los ácidos grasos poliinsaturados son los n-3 los que más aportan en larvas D y pediveliger (7,05 y 15,84%, respectivamente) y dentro de éstos los n-3 HUFA (5,95 y 11,57%), siendo en postlarva los valores de todos los grupos de ácidos grasos insaturados (n-3, n-6 y n-9) similares (9; 6,6 y 7,69%, respectivamente).

En el conjunto de los estadios larvarios, los ácidos grasos poliinsaturados más abundantes son DHA (4.2%), EPA (2.3%) y 18:2n6 (2.5%); en cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados los principales son 18:1n9 (4.3%), 18:1n7 (2.5%) y 16:1n7 (2.5%); hay que destacar en los tres estadios, dentro de los dimetil acetil, el dma18:0 (3.3%).

En la tabla XXVII se presenta la composición de ácidos grasos de los lípidos totales, según los valores medios del contenido en ácidos grasos (% y mg/mg PsInd) y, en los grupos más relevantes para cada estadio larvario incluyendo también los ovocitos (de las puestas originadas por progenitores de Huelva).

El valor del ácido graso anteiso 15:0 aparece en niveles muy elevados (84,86; 40,36 y 34,88%) en tres muestras de larvas D (2jun10 LD1, 24jun10 LD1, 29jul10 LD3, respectivamente), por lo que se han utilizado para los cálculos de larva D sólo las 13 muestras restantes. Los ácidos grasos i-14:0; i15:0; a15:0 e i16:0 son ácidos grasos derivados de fosfolípidos específicos de bacterias heterotróficas y quimioautotróficas (Evrard, 2007).

La mayor pérdida en ácidos grasos se produce en el desarrollo embrionario hasta larva D, siendo los únicos ácidos grasos que presentan algún incremento: i-14:0 y a-15:0, específicos de bacterias, y el 24:0; también se produce un incremento en la relación 20:4n-6/20:5n-3 (AA/EPA) y MUFA/ ω 3 HUFA. El aumento de los ácidos grasos específicos de bacterias concuerda con los resultados obtenidos en los estudios microbiológicos realizados a lo largo del proyecto, ya que las larvas D presentaban un elevado número de bacterias.

Según los datos expuestos y viendo la evolución del contenido de ácidos grasos, desde ovocito, la energía necesaria durante el período lecitotrófico (sin alimentación exógena) prácticamente se soporta con los ácidos grasos: 14:0; 16:0; 18:0; 16:1n7; 18:1n9; 18:1n7 y EPA.

Comparando el contenido de ácidos grasos y de los grupos principales de ácidos grasos entre las larvas D que han obtenido más supervivencia y el resto, no presentan diferencias significativas. Realizando la comparación entre las larvas D de todas las puestas, sí encontramos diferencias significativas en la composición de ácidos grasos, pero estas diferencias son muy aleatorias sin quedar definido un patrón entre las distintas puestas respecto a su evolución posterior. En cuanto a las larvas D provenientes de los ovocitos de los individuos del medio natural (21 junio 2010), que destacaron con diferencias significativas en su composición en ácidos grasos, destacan de nuevo con diferencias significativas con valores elevados en la relación ω 3/ ω 6 y con valores bajos en las relaciones AA/EPA y AA/DHA (ANOVA; $p=0.02$; $p=0.001$, $p=0.005$, respectivamente).

Las larvas de 14 días, las que han obtenido mayor supervivencia, presentan una mayor cantidad de los grupos MUFA, PUFA, n-3, n-6 y n-9 (con una diferencia significativa ANOVA; $p=0.000$). Sin embargo, las larvas de 14 días del 15jul10 se diferencian principalmente del conjunto de las larvas, por tener unos valores elevados de DMA y un poco superiores en ácidos grasos saturados. Además, estas larvas, se diferencian principalmente del conjunto de las larvas por tener unos valores elevados de DMA y un poco superiores en ácidos grasos saturados.

En la figura 54 se observa la evolución de los principales grupos de ácidos grasos (SAT; MUFA; PUFA; DMA; ω 3; ω 3; ω 9 y ω 3HUFA) entre los distintos estadios del desarrollo (desde ovocito hasta postlarva). Realizando un análisis de correlación de Pearson (95%), obtenemos que es significativo entre los PUFA y los ω 3 (0.952), así como entre los ω 3 con los ω 3 HUFA (0.970), pero es importante destacar que hay una importante correlación entre los PUFA, los SAT (-0.982) y DMA (0.972).

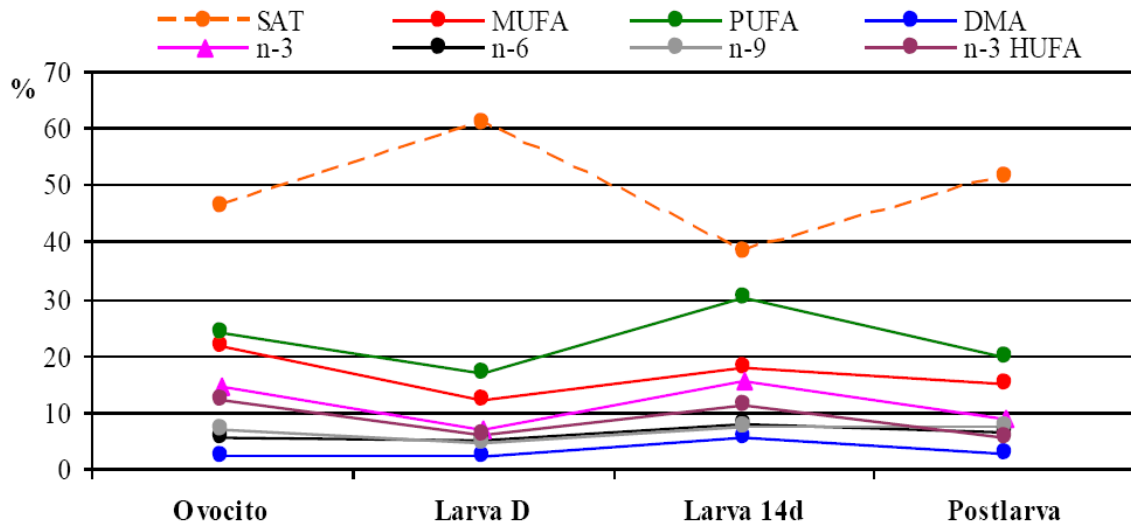


Figura 54.- Evolución de los principales grupos de ácidos grasos desde ovocito a postlarva (% del total de ácidos grasos): SAT; MUFA; PUFA; DMA; ω 3; ω 6; ω 9 y ω 3HUFA. (En los desarrollos larvarios obtenidos de progenitores de Huelva).

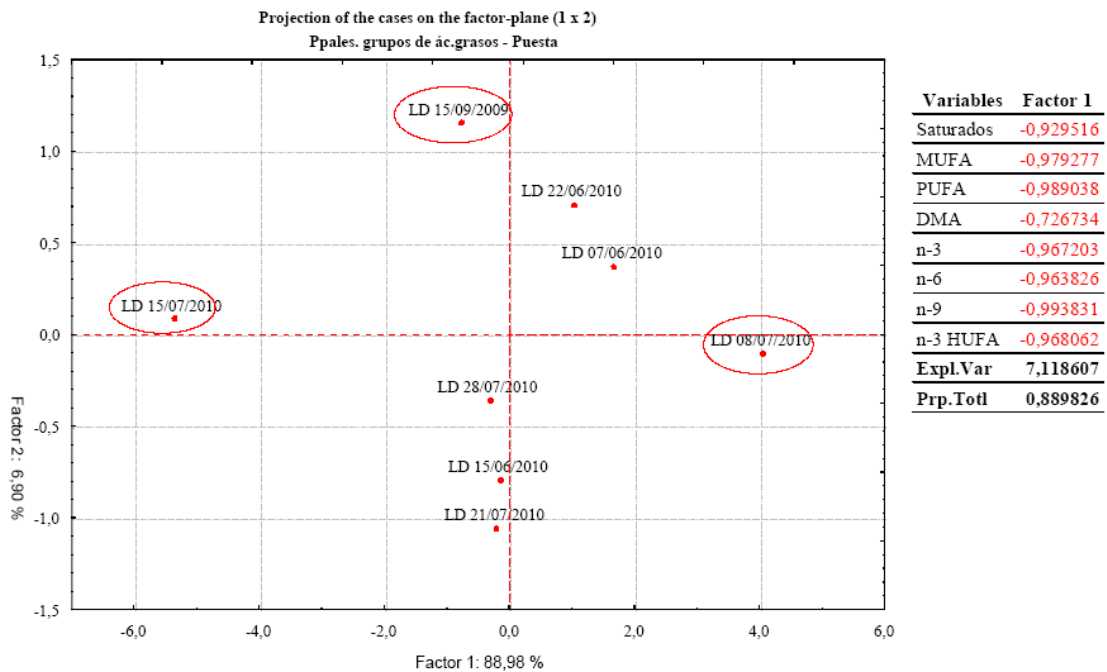


Figura 55.- Factores del análisis de componentes principales para las larvas D según los principales grupos de ácidos grasos. (En los desarrollos larvarios obtenidos de progenitores de Huelva).

Como se aprecia en la figura 55 podemos diferenciar las LD 15/09/09 del resto, debiéndose esta diferencia a poseer valores más elevados de los ácidos grasos que definen el factor 2 (17:1n7; 18:4n1; 18:1n5 y 18:3n6), estas larvas son las únicas obtenidas de puestas de final del verano (septiembre). Respecto al factor 1 hay dos puestas, las LD 08/07/10 y las LD 15/07/10, que se diferencian del grupo principal por presentar valores inferiores y superiores respectivamente de los ácidos grasos determinados por este factor; tenemos que resaltar que las LD

08/07/10 son las que han obtenido la supervivencia más alta (47% al mes de cultivo).

Si comparamos las muestras de todos los estadios larvarios, desde ovocito hasta postlarva, hay una diferencia significativa entre los ovocitos y el resto de los estadios (ANOVA; $p=0.0000$), con los valores más elevados en los ovocitos para los principales grupos de ácidos grasos.

Como se representa en la figura 56, los ovocitos forman un grupo muy correlacionado y claramente separado del resto de las muestras, a excepción de las muestras de septiembre de 2009, que es la única puesta obtenida a finales del verano.

Las larvas D presentan un grupo bastante correlacionado, pero con una composición inversamente proporcional a los ovocitos, es decir, los compuestos presentes en los ovocitos con valores elevados, presentan valores bajos en larva D y al contrario.

El resto de los estadios larvarios, en general, están más dispersos entre sí, aunque mantienen también una diferencia clara con los ovocitos. En esta distribución los ácidos grasos que más influyen son el 22:0 y el 24:0, siendo más abundantes en las larvas D y con valores inferiores, en la mayoría de las larvas de 14 días.

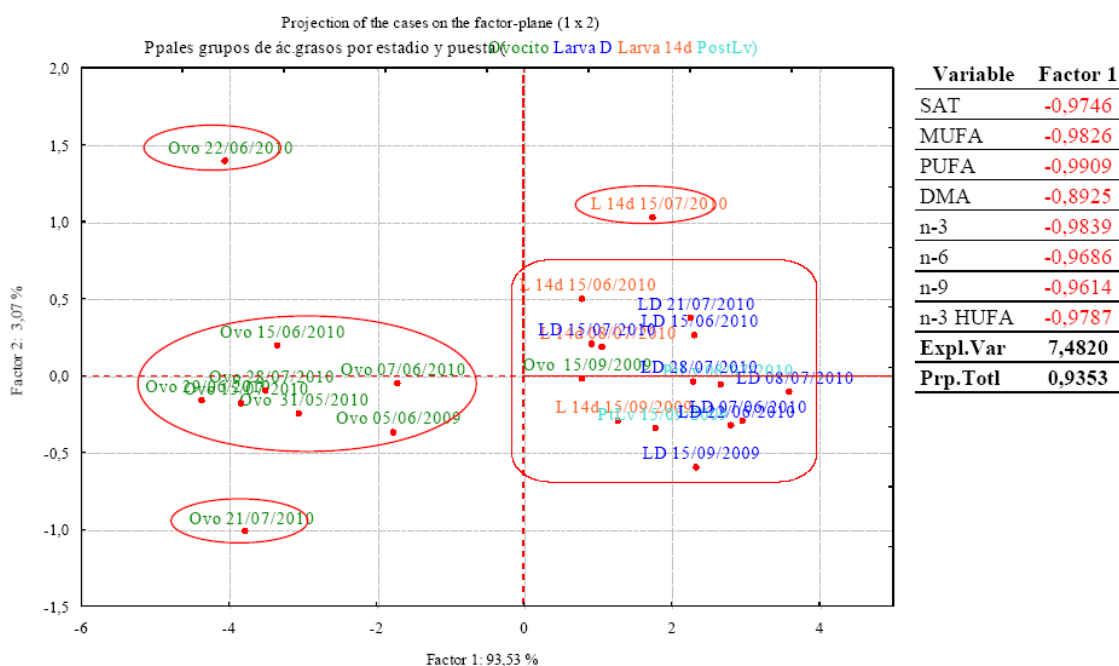


Figura 56.- Factores del análisis de componentes principales para todas las muestras según los principales grupos de ácidos grasos.

Como resultados a todas estas comparaciones, realizadas con los datos obtenidos de los desarrollos larvarios cuyos progenitores fueron de Huelva, podemos destacar:

Se observaron mayores contenidos en lípidos totales en las larvas D que, posteriormente en los cultivos, alcanzaron la metamorfosis.

No se observaron diferencias en la composición de ácidos grasos de las larvas D que han alcanzado una mayor supervivencia respecto a las demás.

En las larvas D hay que destacar un valor elevado de ácidos grasos específicos de bacterias, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los estudios microbiológicos, ya que estas presentaban un elevado número de bacterias.

La energía necesaria durante el período lecitotrófico (sin alimentación exógena) prácticamente se soporta con los ácidos grasos: 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n7, 18:1n9, 18:1n7 y EPA

Las larvas D de la puesta del medio natural destacan con diferencias significativas con valores más altos en la relación n3/n6 y más bajos en AA/EPA y AA/DHA que el resto.

Como conclusión de la composición bioquímica de las larvas D podemos resaltar que las puestas con buenos resultados en supervivencia se han destacado por una mayor proporción de lípidos en la larva D, pero no así en su contenido en ácidos grasos ya que tienen valores bajos tanto en ácidos grasos como en sus principales grupos.

También hay que resaltar que hay una importante correlación entre PUFA/SAT (-0.982) y PUFA/DMA (0.972); y que presentan en general una correlación inversa con la composición de los ovocitos, es decir, los compuestos presentes en los ovocitos con valores elevados, presentan valores bajos en larva D y al contrario.

Las larvas de 14 días que alcanzan mayor supervivencia presentan alto contenido en MUFA, PUFA, n-3, n-6 y n-9.

Los estadios larvarios de 14 días y postlarva respecto a la composición en ácidos grasos presentan una dispersión amplia con las larvas D, que está regida por los ácidos grasos 22:0 y 24:0.

2.4.1.3. Línea 3. Identificación de la microbiota asociada a mortalidades presentes en las diferentes fases del cultivo en criadero

En base a los resultados obtenidos en el plan anterior: Plan Nacional de “Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de almejas” y en las prácticas de seguimiento bacteriológico que se propusieron inicialmente en este proyecto, cada Comunidad Autónoma estudió y evaluó la calidad microbiológica de sus instalaciones y adaptó mejoras que pudieran favorecer la disminución de carga bacteriana a lo largo de los cultivos.

2.4.1.3.1. Tratamientos del agua en los diferentes criaderos de las comunidades participantes en el proyecto

A continuación se muestran los esquemas del circuito del agua en los criaderos de las comunidades participantes en el proyecto, así como los tratamientos aplicados y los puntos críticos de recogida de las muestras para su análisis microbiológico.

En las instalaciones del centro IFAPA Agua del Pino de Andalucía, se han realizado mejoras en el circuito de agua de larvas, independizándose del resto de la instalación, para poder realizarle un mayor filtrado antes de su esterilización y un mayor control de la temperatura, así como para tener un sistema independiente que pueda limpiarse diariamente (Fig. 57).

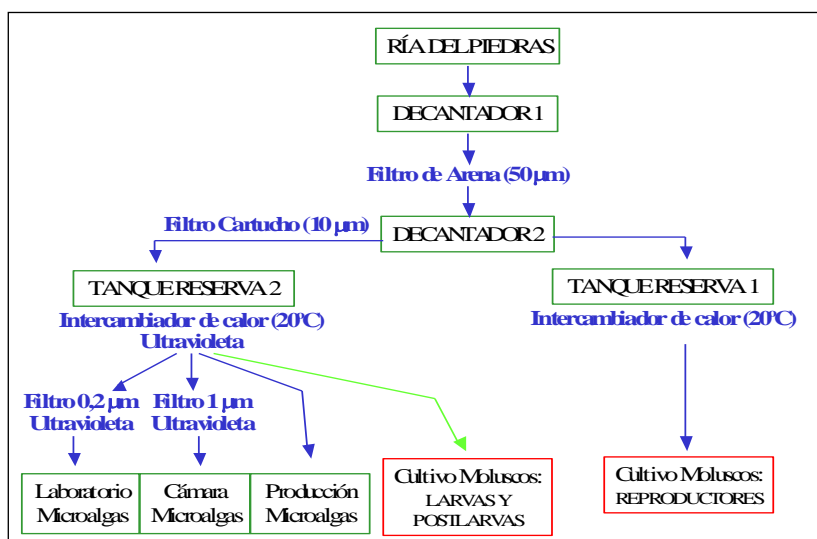


Figura 57.- Esquema del tratamiento de agua para cultivo de algas y moluscos (IFAPA-Agua del Pino).

Las muestras de agua se recogen al final de cada circuito y después de haber pasado por los diferentes tratamientos empleados: laboratorio de microalgas, cámara de microalgas, producción de microalgas y cultivo de moluscos (reproductores, larvas y postlarvas).

La instalación se terminó en mayo de 2008 (Fig. 58), teniendo el agua de mar que se distribuye con las siguientes características: un tratamiento previo a su uso, pasando por un decantador, filtros de arena y una cadena de filtros de cartucho (hasta 10 μm), y almacenándose en un depósito en el que interviene un intercambiador de calor (20°C). El agua de las larvas se capta de esa piscina para el llenado de los tanques de cultivo larvario (150-1.800 L) y circula, por medio de una bomba, por una instalación cerrada con un sistema con filtros de cartucho (hasta 1 μm) y ultravioleta, conllevando además, su vaciado completo diariamente hasta su nuevo uso. Este sistema permite realizar una limpieza con agua dulce del mismo.

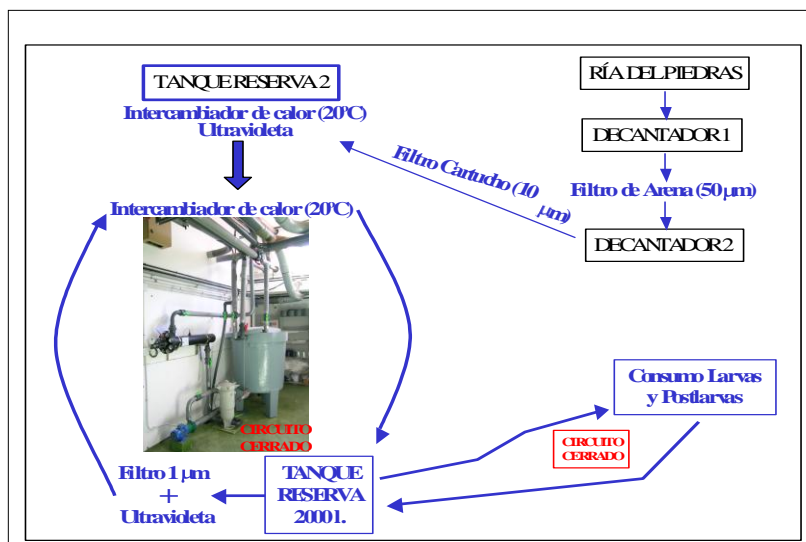


FIGURA 2: Esquema del circuito nuevo (IFAPA Agua del Pino mayo 2008)

Una vez montado el sistema se realizaron ensayos con cultivos larvarios para estudiar la eficacia y validez del mismo respecto al circuito de agua antiguo, para ello se obtuvieron las larvas de los reproductores mantenidos en nuestras instalaciones desde noviembre de 2007 por medio de inducción a la puesta con choque térmico en tanque de 1.000 L. Se realizaron dos cultivos larvarios usando en cada uno el agua de uno de los circuitos, el resto de la metodología del cultivo fue la expuesta anteriormente. Los resultados fueron una supervivencia hasta pediveliger (180 μm) del 53% con el agua del nuevo circuito y un 5% con el circuito antiguo. A partir de estos cambios efectuados en el sistema de agua, obtenemos una supervivencia suficientemente alta en pediveliger como para permitirnos, a partir de ellos, abordar los estudios de este proyecto.

En Cataluña, y en base a los resultados obtenidos en el seguimiento de los puntos críticos en el IRTA, se observó que la calidad del agua a nivel microbiológico era buena, incluso, previamente al uso de los tratamientos de filtración (cartucho, filtro de carbón activo y lámpara UV), por lo que no necesitaron llevar a cabo ninguna mejora en sus instalaciones.

Los puntos elegidos para la recogida de las muestras de agua fueron a la salida de la piscina de decantación primaria, donde no existe tratamiento; a la salida del tanque de decantación previo a la primera filtración de arena; después de la primera y de la segunda filtración por arena así como después de pasar por un skimmer. Las mangueras de llenado de los tanques tienen tres tipos de tratamiento: filtro de cartucho, filtro de carbón activo y lámpara UV y la muestra del agua se coge después de cada tratamiento por separado y al final, con todos los tratamientos funcionando.

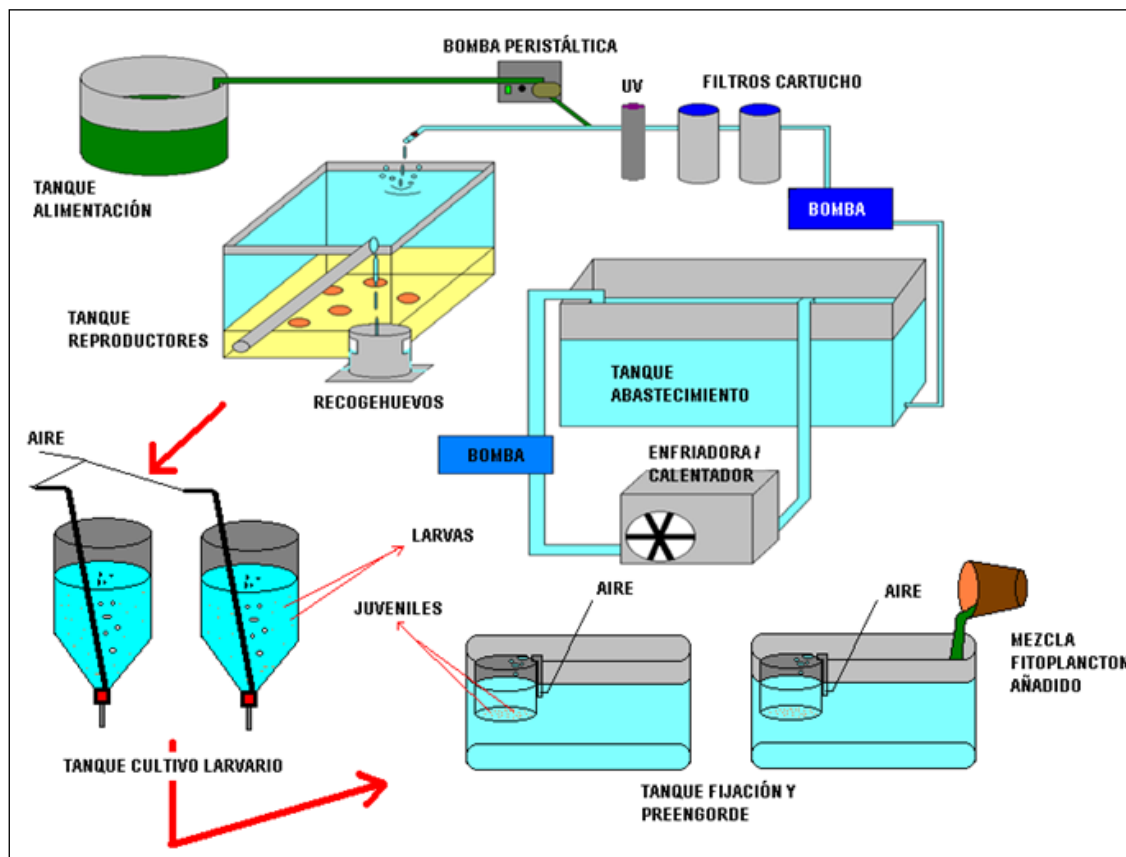


Figura 59.- Representación del funcionamiento de los diferentes cultivos de la sala de moluscos (IRTA).

En Asturias, análisis previos revelaron que el uso de la bomba de impulsión para aumentar el caudal de llenado de los tanques, no ofrecía la garantía necesaria de calidad de agua para llevar a cabo los cultivos larvarios, por lo que se desechó su utilización. Las lámparas UV necesitan un caudal de agua determinado, acorde a sus características, para ser efectivas por lo que al aumentarlo no producen la esterilización necesaria que se requiere.

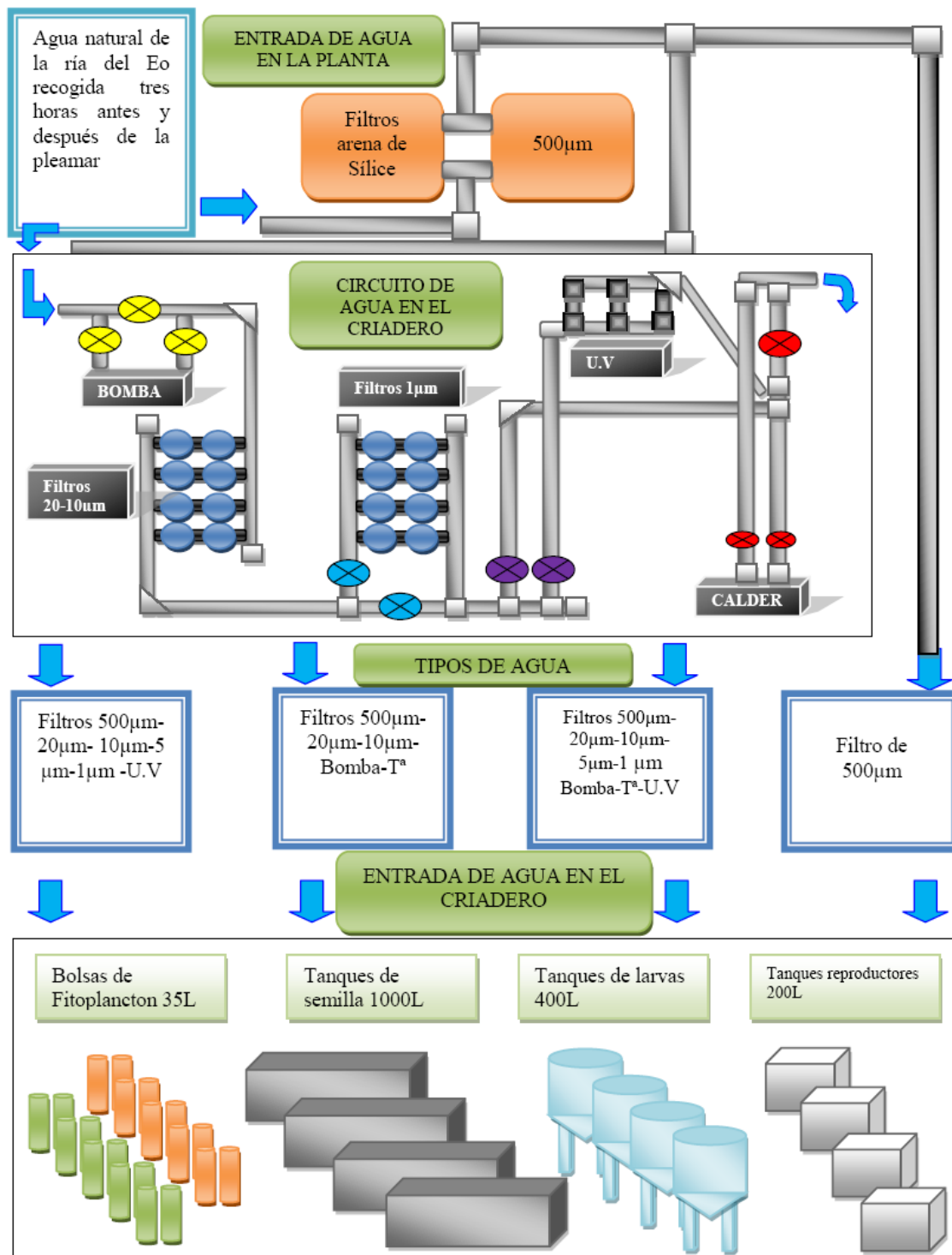
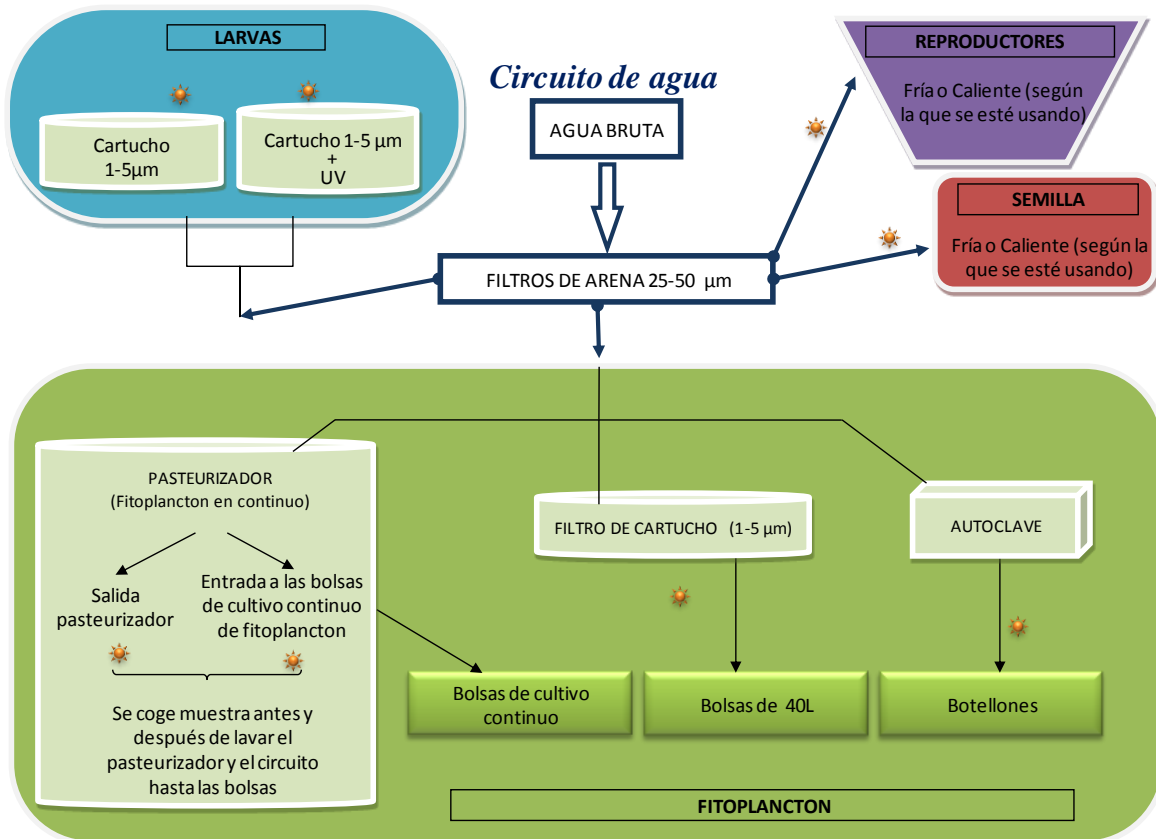


Figura 60.- Circuito y tipos de agua en las distintas fases de cultivo en el criadero del Centro de Experimentación Pesquera (Castropol).

En Galicia, en el Centro de Cultivos Marinos (CIMA) de Ribadeo, se fijaron los puntos críticos de recogida de agua (☀) al final de cada sección de tubería con su correspondiente tratamiento (filtro de arena, cartucho o UV). El criadero tiene

filtros de arena independientes para cada sección: reproductores, semilla, larvas y fitoplancton.

El siguiente esquema representa los diferentes circuitos y los puntos donde se recogen las muestras.



En Cantabria en las instalaciones de la empresa Tinamenor, el agua utilizada procede directamente de un sistema de lagunas alimentado por la ría. Esta agua recibe un tratamiento antes de entrar en la instalación de cría de moluscos: primero pasa por un filtro de arena donde se retienen las partículas superiores a 10 micras, después el agua se trata con un skimmer que elimina diferentes tipos de sólidos en suspensión y proteínas; finalmente pasa por dos filtros de cartuchos de 1 y 0,1 micras, respectivamente y un filtro de carbono activo. Una bomba de calor controla la temperatura del agua.

En general, los resultados obtenidos de los muestreos bacteriológicos en los puntos críticos de cada criadero son buenos e indican que la calidad microbiológica del agua es adecuada para su uso en los cultivos, siendo nulo en crecimiento de vibrios y en valores normales el crecimiento de bacterias marinas heterótrofas. Solo en algunos momentos puntuales se encontraron crecimientos bacterianos preocupantes.

El agua utilizada en el criadero, revela ausencia de crecimiento bacteriano en TCBS y recuentos máximos de 103 ufc/mL, en AM.

Los *filtros de cartucho* ofrecen resultados irregulares en lo que respecta a la carga, tanto de bacterias heterótrofas marinas como de vibrios. Un problema de los filtros puede ser su mantenimiento, ya que si no se limpian y se cambian en el

momento adecuado, pueden convertirse en un punto de acumulación de bacterias que se incorporarán al sistema.

La combinación de filtro de cartucho-radiación UV reduce sólo ligeramente la carga media de bacterias heterótrofas marinas, y no garantiza una reducción de los valores máximos. En cuanto a la media de vibrios, va desde valores mínimos a estimaciones superiores a las obtenidas para los puntos sin tratamiento adicional. La eficacia del uso de la radiación UV, es por tanto irregular, y su uso debe estar muy controlado para que realmente sea efectivo.

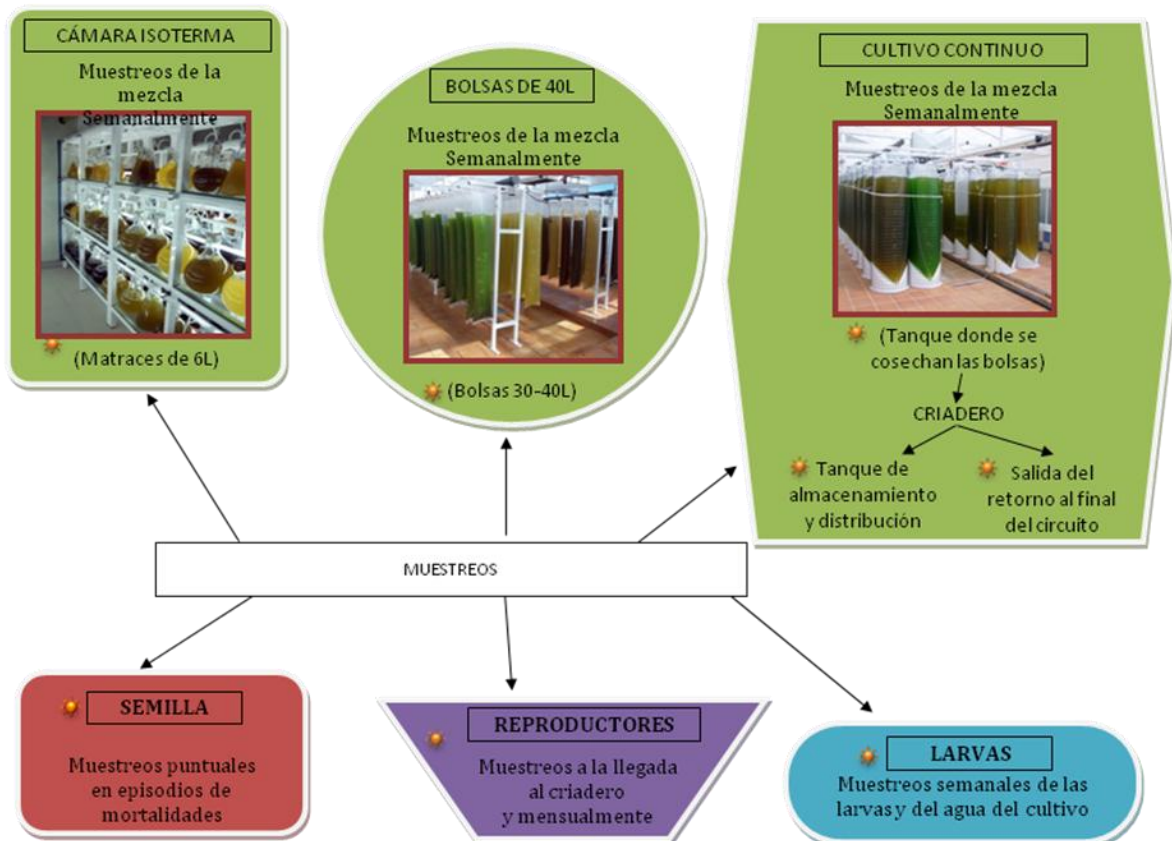
2.4.1.3.2. Control bacteriológico de los diferentes cultivos que se realizan en los criaderos: fitoplancton y cultivos larvarios, así como el mantenimiento de los reproductores

Además de las muestras del agua, se coge también muestra del fitoplancton producido en los criaderos y en cada sistema de cultivo, que generalmente son el cultivo en matraces y en bolsas. Algunos criaderos disponen también de un sistema de cultivo en continuo.

Por otra parte, se coge muestra de los reproductores a su llegada al criadero y mensualmente se hacen pruebas de acondicionamiento.

Cuando se hacen pruebas de cultivo larvario se cogen muestras semanales, tanto de las propias larvas como del agua de cultivo en el propio tanque.

De la semilla sólo se recogen muestras puntuales en caso de que se produzcan episodios de mortalidades sin causas conocidas.



Fitoplancton: los recuentos habituales de bacterias marinas heterótrofas en el fitoplancton estuvieron alrededor de 103 – 107 ufc/mL. Los vibrios presentaron valores muy bajos, desde la no detección hasta un máximo de 103 ufc/mL. Generalmente los recuentos son inferiores o nulos en el fitoplancton cultivado en matraces respecto a las bolsas esto se debe a que el agua de los matraces además de los tratamientos de filtración, es esterilizada en autoclave. Los resultados obtenidos permitieron aportar información para mejorar el alimento suministrado en el criadero y actuar, por ejemplo, renovando las cepas usadas para inocular los matraces cuando fuera necesario.

Con la sustitución del fitoplancton de bolsa por el del cultivo continuo en los criaderos que lo tienen, se mostró una mejora sustancial en la calidad microbiológica del alimento.

Reproductores: en los resultados derivados de las siembras de los tejidos de los reproductores y del agua, no se observa ninguna tendencia clara en cuanto al crecimiento de bacterias marinas heterótrofas, siendo notable el crecimiento en momentos puntuales. Posiblemente esta carga bacteriana también se vea favorecida por las bacterias marinas heterótrofas asociadas al fitoplancton. Según el origen de los reproductores, la carga bacteriana es diferente, llegando incluso en los reproductores que llegan más cargados a ser una causa que haya problemas de mortalidades en los cultivos larvarios. Por eso es muy importante analizar los reproductores a su llegada al criadero para poder realizar tratamientos previos de depuración para rebajar la carga bacteriana inicial todo lo posible. Estos tratamientos se deben repetir durante el acondicionamiento y también unos días antes a la inducción a la puesta.

Cultivos larvarios: con los datos de las siembras de los cultivos larvarios, se han obtenido valores cuantitativos y cualitativos. Tanto en las muestras de AM como en las de TCBS, la tendencia de todas ellas es similar. En un primer momento se observa una alta presencia de bacterias y vibrios, descendiendo el nº en siembras posteriores para presentar un repunte en la fase de fijación y postlarva. También se han observado con algunas puestas, un pequeño pico de bacterias heterótrofas marinas y de vibrios a mitad del cultivo larvario, justamente coincidiendo con el final de la fase mixotrófica de las larvas.

Analizando los controles bacteriológicos de varias experiencias de cultivo larvario realizadas, y contrastándolos con las supervivencias obtenidas en las mismas, nos encontramos que recuentos en TCBS $\geq 10^3$ dan como resultado que las larvas no completan el desarrollo. Además de la carga bacteriana que presentan las larvas, esta carga se ve incrementada por la adición de fitoplancton a los cultivos, de ahí la importancia de controlar su calidad microbiológica.

Además, se aislaron todas aquellas bacterias presentes en las siembras. De manera que se obtuvo una colección bacteriana que se caracterizó mediante métodos bacteriológicos clásicos en placa y tubo. El estudio se centró en aquellas bacterias fermentativas, presuntamente pertenecientes al género *Vibrio*, al que pertenecen la mayoría de los patógenos de larvas de bivalvos. Dentro de este grupo, se prestó especial atención a aquellos que presentaran el perfil de aminoácidos más común entre estos patógenos larvarios.

Una vez identificados aquellas cepas que presentaban el perfil buscado, se caracterizaron por métodos moleculares, mediante la secuenciación del ADNr 16S. En el género *Vibrio* se encuadraron 7 aislados. Dos aislados se ubicaron en

el clado de *Vibrio splendidus*, tres formaron un grupo robusto en una nueva rama del árbol filogenético (próxima a *V. orientalis*, *V. tubiashii* y *V. rotiferianus*), y otros dos aislados no pudieron ser relacionados con ninguna especie conocida.

2.4.1.3.3. Prueba de depuración de reproductores

Prueba de depuración durante el acondicionamiento

Al cabo de las primeras dos semanas, en que cada lote se mantuvo en diferentes condiciones de alimentación y temperatura, los resultados de los análisis microbiológicos (Tabla XXVIII) mostraron que los menores recuentos de vibrios (PV) se correspondían con el lote T^a20°C-sin alimento, presentando la media (2,9x10² ufc/g) y el valor máximo (2.0x10³ ufc/g) más bajos de todos los tratamientos. La carga de muchos individuos de ambas réplicas estuvo por debajo del límite de detección. Además, el desarrollo gonadal de las almejas de estos lotes fue en conjunto el mayor, estando prácticamente todas en fase de maduración-puesta (3-4). La carga media de bacterias marinas totales (BMT) fue también la más baja (7.7x10³ ufc/g), lo mismo que ocurrió con el valor máximo (2.6x10⁴ ufc/g).

El otro tratamiento a considerar fue el de T^agradiente-con alimento, con buenos resultados en la carga media de vibrios (1.5x10³ ufc/g) y bacterias marinas totales (3.9x10⁴ ufc/g), y sus respectivos valores máximos (8.0x10³ y 8.7x10⁴ ufc/g, para PV y BMT). El desarrollo gonadal de estos lotes fue bajo (3), aunque hay que señalar que se debió sobre todo a la presencia de algún individuo en fase de reposo.

Con los otros dos tratamientos la carga de PV no se redujo, presentando valores similares o superiores al control inicial, lo mismo que se observó en los recuentos de BMT.

Tabla XXVIII.- Carga bacteriana en la gónada de reproductores sometidos a diferentes acondicionamientos. Control intermedio a los 15 días. Los valores medios, máximo y mínimo se expresan en ufc/g. Para el desarrollo gonadal se utilizó la escala 0-4. *n.d.: por debajo del límite de detección.

	Acondicionamiento			
	T ^a 20°C		T ^a gradiente	
	sin alimento	con alimento	sin alimento	con alimento
Desarrollo gonadal	3.5	3.4	3.0	3.0
TCBS				
media	2.9 x 10 ²	1.1 x 10 ⁴	8.0 x 10 ⁴	1.5 x 10 ³
máximo	2.0 x 10 ³	8.3 x 10 ⁴	7.0 x 10 ⁵	8.0 x 10 ³
mínimo	n.d.	n.d.	1.2 x 10 ²	n.d.
AM				
media	7.7 x 10 ³	8.3 x 10 ⁵	3.1 x 10 ⁵	3.9 x 10 ⁴
máximo	2.6 x 10 ⁴	3.4 x 10 ⁶	2.7 x 10 ⁶	8.7 x 10 ⁴
mínimo	n.d.	8.6 x 10 ³	2.4 x 10 ³	n.d.

Los resultados del control final, después de 1 mes en el criadero (Tabla XXIX), fueron sustancialmente mejores para el tratamiento T^a20°C-sin alimento, obteniéndose valores medios de PV (1.0x10³ ufc/g) y BMT (7.1x10⁴ ufc/g) por debajo de los registrados en el control inicial. De nuevo apuntar que además muchos de los individuos mostraron una carga de vibrios por debajo del límite de detección de la prueba. Y no sólo eso, sino que el desarrollo gonadal fue el máximo alcanzado con los distintos tratamientos, con casi todos los individuos en fase de puesta.

Tabla XXIX.- Carga bacteriana en la gónada de reproductores sometidos a diferentes acondicionamientos. Control final al mes de haber comenzado la prueba. Los valores medios, máximo y mínimo se expresan en ufc/g. Para el desarrollo gonadal se utilizó la escala 0-4. *n.d.: por debajo del límite de detección.

	Acondicionamiento			
	T ^a 20°C		T ^a gradiente	
	sin alimento	con alimento	sin alimento	con alimento
Desarrollo gonadal	3.7	3.1	3.4	3.4
TCBS				
media	1.0 x 10 ³	1.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁵	3.2 x 10 ⁴
máximo	3.9 x 10 ³	6.5 x 10 ⁴	3.0 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵
mínimo	n.d.	n.d.	3.9 x 10 ³	n.d.
AM				
media	7.1 x 10 ⁴	7.5 x 10 ⁴	4.4 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵
máximo	4.8 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁵
mínimo	n.d.	2.9 x 10 ³	2.8 x 10 ⁴	n.d.

Si se analizan las diferencias entre réplicas, en ambos controles se observaron diferencias de sólo 1 orden de magnitud (1 log) para la carga media de vibrios, independientemente del tratamiento. Los recuentos de bacterias marinas totales fueron aún más homogéneos, estando los valores medios en el mismo orden de magnitud, con la única excepción de las réplicas del control final del tratamiento T^a20°C-sin alimento (\approx 1 log).

En lo que respecta a las diferencias entre individuos dentro de un mismo lote, las observadas en el tratamiento T^a20°C-sin alimento se correspondieron principalmente con el distinto grado de reducción de vibrios. Esto quiere decir que la carga de vibrios disminuyó en todos los individuos de todos los lotes, en mayor o menor medida.

Los individuos del tratamiento T^agradiente-con alimento mostraron menor dispersión en la población, pero con valores atípicos extremos. Esto indica que hay grandes diferencias, con una reducción de la carga de vibrios muy acusada, pero sólo en algunos individuos.

Los resultados del tratamiento T^a20°C-con alimento no siguieron una pauta, con dispersión en algunas poblaciones, mientras otras presentaron una carga homogénea, pero con valores atípicos extremos.

Finalmente, en los individuos sometidos a T^agradiente-sin alimento se observaron valores más homogéneos, sin disminución de la carga bacteriana.

Las distintas condiciones del acondicionamiento ensayadas parecen afectar principalmente a las poblaciones de vibrios asociadas a la gónada de los reproductores, en mucha mayor medida que a las de bacterias marinas totales.

Se puede conseguir una reducción de la carga de vibrios en los reproductores con el tratamiento T^a20°C-sin alimento. Con este tratamiento se logró el mejor desarrollo gonadal.

En este experimento y bajo estas condiciones se consiguieron los resultados más consistentes.

En cuanto al efecto de los tratamientos según el sexo de los individuos, en el control al cabo de 2 semanas (Tabla XXX) se observó que los valores medios de la carga de vibrios fueron siempre mayores en las hembras que en los machos de los mismos grupos, con diferencias de 1-2 logaritmos. Algo similar se observó con el desarrollo gonadal, con valores para las hembras mayores o iguales, que los obtenidos para los machos bajo el mismo tratamiento.

Tabla XXX.- Efecto de cada una de las condiciones estudiadas sobre la carga de vibrios (PV) y el desarrollo gonadal de los reproductores. La carga media de vibrios expresa en ufc/g. Para el desarrollo gonadal se utilizó la escala 0-4. Control intermedio (2 semanas).

		Temperatura		Alimento	
		gradiente	20°C	sin alimento	con alimento
Machos	PV (ufc/g)	2.0 x 10 ³	8.4x10 ²	9.5x10 ²	1.7x10 ³
	Des. gon.	3.0	3.3	3.1	3.2
Hembras	PV (ufc/g)	7.3x10 ⁴	1.1x10 ⁴	7.3x10 ⁴	1.2x10 ⁴
	Des. gon.	3.0	3.7	3.4	3.3

En conjunto, los resultados mostraron que, tanto en machos como en hembras, el factor con más influencia fue la temperatura, frente a la alimentación. Comparando machos y hembras, con y sin alimento, los valores de maduración gonadal y PV fueron similares. Sin embargo, el desarrollo gonadal fue mayor a 20°C respecto al gradiente, y la carga de vibrios menor. Así, la mejor relación carga de vibrios-desarrollo gonadal se obtuvo para ambos sexos con T^a 20°C.

En el control final (Tabla XXXI), no se observaron diferencias entre sexos en lo que se refiere a carga media de vibrios para cada una de las condiciones estudiadas. En cuanto al grado de maduración gonadal, de nuevo fue siempre mayor en hembras respecto a los machos bajo las mismas condiciones. La mejor relación carga de vibrios-desarrollo gonadal de nuevo fue la obtenida para ambos sexos con T^a 20°C.

Para el desarrollo gonadal se utilizó la escala 0-4. Control final (4 semanas).

Tabla XXXI.- Efecto de cada una de las condiciones estudiadas sobre la carga de vibrios (PV) y el desarrollo gonadal de los reproductores. La carga media de vibrios expresa en ufc/g.

		Temperatura		Alimento	
		gradiente	20°C	sin alimento	con alimento
Machos	PV (ufc/g)	7.0 x 10 ⁴	1.9x10 ³	6.1x10 ⁴	1.6x10 ⁴
	Des. gon.	3.3	3.4	3.4	3.3
Hembras	PV (ufc/g)	5.3x10 ⁴	9.9x10 ³	3.0x10 ⁴	2.8x10 ⁴
	Des. gon.	3.7	3.5	3.8	3.4

Prueba de depuración previa a la inducción a la puesta

Los resultados obtenidos se representan en unidades formadoras de colonias (ufc)/mL (Tabla XXXII).

Tabla XXXII.- Recuentos bacteriológicos en gónada (ufc/mL).

	Almeja sin depurar		Almeja depurada	
	TCBS	AM	TCBS	AM
Desove: 7 mayo	2x10 ⁸	8x10 ⁸	3x10 ⁵	1,5x10 ⁶
Desove: 30 junio	1,6x10 ⁷	6x10 ⁷	2x10 ⁴	4x10 ⁵

Los resultados muestran que la estabulación de los reproductores en agua de mar filtrada y esterilizada, 48 horas antes del desove, reduce considerablemente la flora bacteriana de la gónada y por lo tanto de los ovocitos en el momento del desove. También se observa que las almejas desovadas el 7 de mayo y acondicionadas desde el mes de noviembre con agua natural filtrada por arena de 500 µm, presentan una carga bacteriana sensiblemente superior al lote desovado el 30 de junio, que procedían directamente del medio natural.

2.4.1.3.4. Uso de antibiótico en los cultivos larvarios

La carga de bacterias marinas totales del agua de cultivo no mostró diferencias entre el cultivo cAb y sAb, con valores de 104-105 unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml). El efecto del antibiótico sí se reflejó en los recuentos de presuntos vibrios, estimados en TCBS, ya que mientras apenas se detectaron en el agua de cultivo cAb, estuvieron presentes a lo largo de todo el cultivo sAb (Fig. 61). Este efecto no se observó sin embargo en la microbiota de las larvas, que presentaron vibrios en ambos cultivos.

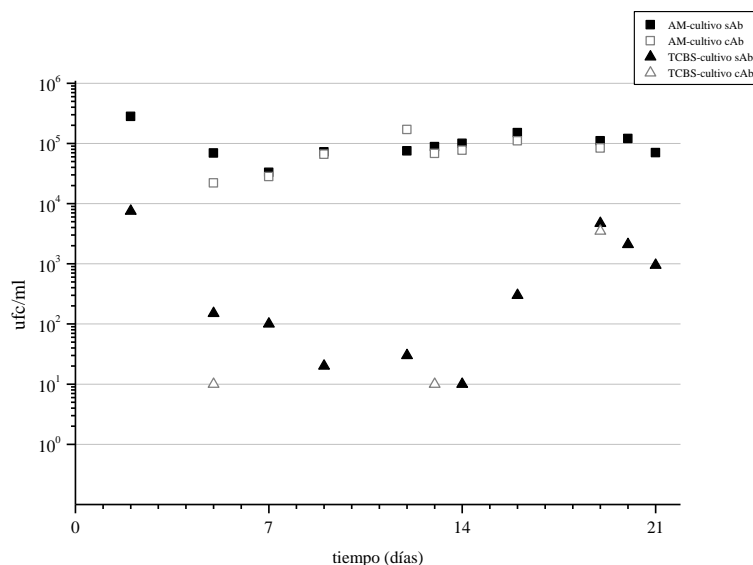


Figura 61.- Recuentos de bacterias marinas totales (AM) y presuntos vibrios (TCBS) en el agua de cultivo larvario de almeja fina, sin (sAb) y con antibiótico (cAb).

Se obtuvieron un total de 52 aislados, 11 procedentes de las muestras anteriores al comienzo del tratamiento y 41 de los cultivos paralelos con y sin antibiótico. La caracterización se centró en las cepas procedentes del medio TCBS (presuntos vibrios), un total de 32 aislados: 6 de las muestras iniciales (2 de larvas y 4 del agua de cultivo), 16 del cultivo sAb (7 de larvas y 9 de agua) y 10 del cultivo cAb (5 larvas y 5 de agua). Estos aislados están siendo caracterizados fenotípicamente y se seleccionarán cepas representativas de los distintos tipos para su identificación mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. Así se obtendrá información de la dinámica de los vibrios en los cultivos, desde la carga bacteriana inicial hasta aquella que vaya apareciendo por aportes externos o cambios en el equilibrio de poblaciones, incluyendo aquí el efecto del uso de antibiótico. Además, la identificación de los aislados relacionados con las mortalidades facilitará la búsqueda de posibles patógenos bacterianos de los cultivos larvarios de almeja fina en criadero.

2.4.1.3.5. Estudios preliminares del uso de antibiótico en el cultivo de almeja japonesa en criadero

Prueba 1

Temperatura

Durante toda la prueba 1, la temperatura se mantuvo entre los 23 y los 24,5°C.

Supervivencia

En ambos tratamientos la supervivencia final promedio fue baja. Uno de los tanques del tratamiento Flr tuvo una supervivencia del 50% a día 30, mientras el segundo tanque tuvo tan sólo un 10%. La supervivencia de ambos tanques de A+E fue baja, con un 10% y un 1%, respectivamente.

Bacteriología

La tabla XXXIII muestra los valores de CFUs en Marine Agar y TCBS resultado de las siembras de las muestras de los tanques de la prueba.

Tabla XXXIII.- CFUs de las siembras en Marine agar y TCBS entre día 20 y día 30 de cultivo en los distintos tanques de tratamiento.

Día	MA				TCBS			
	AE1 CFUs	AE2 CFUs	Flr1 CFUs	Flr2 CFUs	AE1 CFUs	AE2 CFUs	Flr1 CFUs	Flr2 CFUs
20	1,6E+04	8,0E+03	1,5E+04	7,0E+03	5,0E+01	0,0E+00	3,4E+02	1,1E+02
21	1,3E+05	1,2E+05	5,8E+04	1,1E+04	7,0E+03	2,4E+03	1,1E+04	1,0E+01
22	1,6E+05	3,6E+05	2,0E+05	5,3E+05	5,8E+03	7,0E+02	1,5E+04	2,0E+02
23	3,1E+05	3,5E+05	5,5E+05	5,6E+05	2,3E+04	2,4E+04	6,7E+04	2,0E+02
24	4,2E+05	6,2E+04	3,1E+05	3,9E+05	7,0E+03	7,0E+03	6,0E+03	0,0E+00
25	4,9E+05	4,0E+05	4,0E+05	4,5E+05	4,0E+03	1,2E+04	1,2E+04	1,3E+03
26	7,7E+05	8,0E+05		3,4E+05	0,0E+00	7,0E+03	2,0E+03	1,0E+02
27	3,5E+05	3,5E+05	3,5E+05	3,0E+05	1,2E+03	2,2E+03	1,2E+03	0,0E+00
28								
29								
30	8,0E+04	2,7E+05	1,3E+05	4,9E+05	0,0E+00	0,0E+00	2,0E+03	6,0E+03

Se aprecia cómo la proporción de vibronáceas en el medio disminuye a lo largo de la duración de la prueba. Sin embargo hay que reseñar de nuevo el comportamiento distinto de uno de los tanques de Flr, cuyo porcentaje de vibronáceas se mantuvo por debajo del 2% en todos los muestreos, correspondiéndose estos valores, como ya hemos mencionado, con una supervivencia más elevada.

Prueba 2

Temperatura

Durante esta parte de la prueba la temperatura de los tanques se mantuvo mayoritariamente en un rango de entre 23 y 25°C, que es el rango de temperatura deseado. En general, en esta primera parte podemos ver que la temperatura se mantiene bastante estable en todos los tanques, con una temperatura media entre 23,7 y 24,1°C.

Gases en disolución

En cuanto a los gases en disolución encontramos un rango de 10 a 20% de saturación. Podemos ver que no es una variable que se mantenga estable a lo largo del período de duración de esta parte de la prueba, pero si sigue aproximadamente el mismo modelo en todos los tanques. La media de los gases disueltos en cada tanque está entre 14-16, siendo más alta la media de los tanques T01(15,5) y T06 (15,3) y la más baja la del T02 (14,5). El ideal sería que los gases en disolución estuviesen en cero.

Ingesta

El porcentaje de ingesta es otra de las características del estudio que presenta bastante variabilidad a lo largo de los días de duración de la prueba. El tanque que tiene un porcentaje medio de ingesta mayor es el T02 con un 53,5% y el T01 es el que menor porcentaje medio tiene con un 30,3%. La ingesta media de los seis tanques de esta parte de la prueba la encontramos entre 30-55%.

Crecimiento y supervivencia larvario

Para ver el crecimiento larvario de cada tanque se ha medido la talla media de las larvas cada dos-tres días. Podemos ver en la fig.62 que todos los tanques tienen una curva de crecimiento similar, excepto el T01 donde observamos que entre los días 6 y 8 de edad, las larvas apenas presentan aumento de talla aunque luego vuelva a alcanzar un crecimiento parecido al resto.

El tanque que alcanza una talla mayor es el T03 y el que presenta una talla menor es el T06.

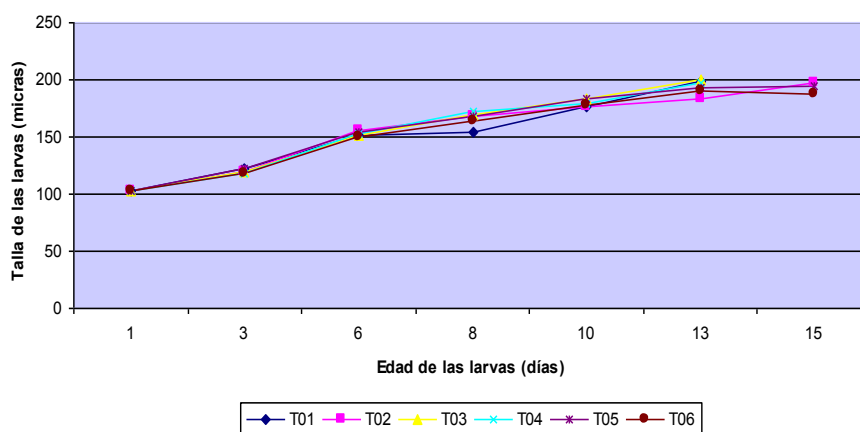


Figura 62.- Evolución de la talla de las larvas de cada tanque.

El porcentaje de supervivencia ronda el 100 - 90% en todos los tanques.

Bacteriología

Se calcula el porcentaje de bacterias del género *Vibrio* sp. presente en cada tanque (Tabla XXXIV) respecto al nº total de cfu de bacterias marinas totales presente. Podemos ver que los tanques que presentan un mayor porcentaje son T03 y T04. Esto se debe a que estos dos tanques estuvieron varios días sin

tratamiento a modo de prueba, de ahí que la carga bacteriana presente en TCBS de estos dos tanques aumente de manera importante. Este período prolongado sin el tratamiento, se realizó para determinar cada cuánto tiempo se tendría que suministrar el antibiótico a los tanques. Si no tenemos en cuenta estos datos (en la tabla, XXXIV) vemos que los tanques que presentan una cantidad de bacterias del género *Vibrio* sp. más alta son realmente el T01 y el T02, que son los tanques que han sido tratados con OTC.

Tabla XXXIV.- Bacteriología.

FECHA	TANQUES					
	T01 (OTC)	T02 (OTC)	T03 (-)	T04 (-)	T05 (Florfen)	T06 (Florfen)
30.06.11	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
01.07.11	0,22%	0,13%	0,11%	0,00%	0,05%	0,00%
02.07.11	< 0,33%	< 0,32%	< 0,01%	< 0,01%	< 0,04%	0,00%
03.07.11	0,20%	0,15%	0,00%	0,21%	0,02%	0,09%
05.07.11	0,19%	0,40%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%
06.07.11	1,13%	3,60%	0,00%	0,02%	0,08%	0,00%
07.07.11	0,48%	0,76%	0,00%	0,03%	0,05%	0,07%
08.07.11	2,06%	0,00%	0,09%	2,69%	0,48%	0,49%
09.07.11	0,34%	0,00%	0,42%	< 4,60%	< 0,59%	< 2,40%
10.07.11	0,04%	0,00%	0,89%	0,00%	0,02%	0,00%
12.07.11	0,00%	0,00%	26,16%	0,00%	0,00%	0,00%
13.07.11		0,00%	0,38%		0,00%	0,01%
14.07.11		0,00%	0,53%		0,00%	< 0,02%
15.07.11			< 0,18%			0,06%
PROMEDIO	< 0,45%	< 0,41%	< 2,06%	< 0,69%	< 0,10%	< 0,22%
PROMEDIO'	< 0,45%	< 0,41%	< 0,20%	< 0,30%	< 0,10%	< 0,22%

Metamorfosis

Temperatura

El rango de temperatura que presentan los tanques de estudio durante el período de tiempo que dura esta parte de la prueba está entre 26 y 29°C. De entre los tres tanques que tenemos, el más variable es el TRB, que llega a tener 26°C cuando las larvas presentan 20 días de edad y alcanza los 28,5°C en varias ocasiones. La temperatura media de los tanques ronda los 28°C, siendo TRB el que menor

temperatura media tiene (27,8°C) y TRC el que tiene la temperatura media más elevada (28,2°C).

Gases en disolución

Para los gases en disolución presentes en los tres tanques encontramos un rango de 7 a 17 porcentajes de saturación. En esta parte de la prueba sigue siendo una variable poco estable, pero se mantiene en un rango algo inferior al visto en la parte anterior. El TRB es el que presenta un rango más bajo de gases disueltos en el agua. La media de los gases se encuentra entre 10 y 11, siendo más bajo en TRB (10,3) y más alto en TRC (10,9).

Ingesta

El porcentaje de ingesta que presentan los tanques en esta parte de la prueba es variable y sigue un patrón más o menos similar en todos los tanques. Tenemos un porcentaje de ingesta medio que ronda el 50%, el tanque que presenta un porcentaje mayor es el TRA (55,5%) y el que tiene un porcentaje menor es el TRC (47,8%).

Crecimiento larvario

Para ver el crecimiento larvario se hace de la misma manera que en la primera parte. En la figura 63 podemos ver que los tres tanques siguen un patrón de crecimiento similar. El TRB es el tanque que presenta un crecimiento mayor, seguido del TRA y el TRC (colas) es que el que tiene menor crecimiento.

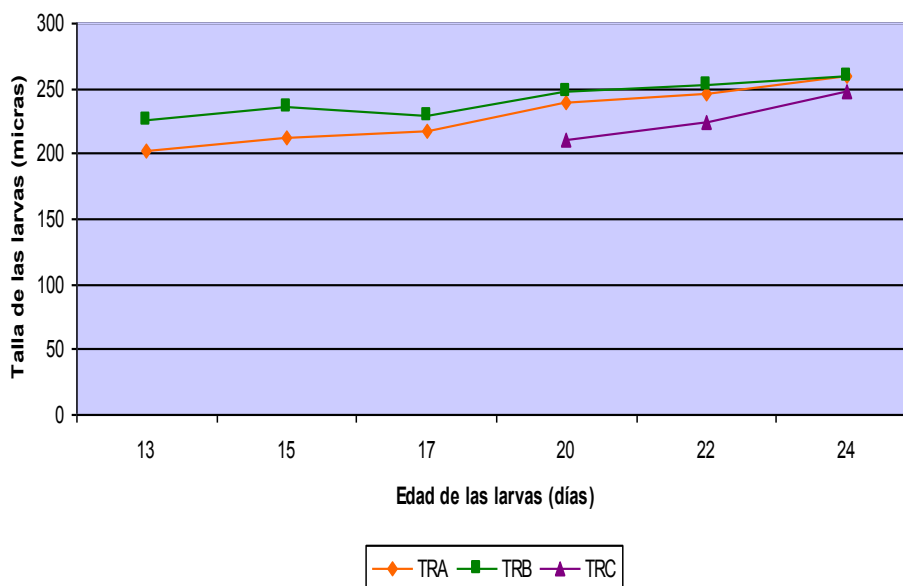


Figura 63.- Evolución de la talla de las larvas de cada tanque.

Supervivencia y semilla

La supervivencia de las larvas ha ido disminuyendo con el paso de los días. Se ve un descenso más acentuado a partir del día 28 de cultivo. Hasta el día 30 el TRA es el que presenta mayor supervivencia, pero el día 32 cuando termina la prueba el TRC es el que posee la supervivencia más alta. Una vez que la mayoría de las larvas pasan la metamorfosis, la supervivencia empieza a mantenerse estable.

El porcentaje de semilla aumenta de manera gradual desde el día 25 al 28 de cultivo, incrementándose de manera más importante del día 28 al 32 cuando finaliza la prueba, al tener ya la mayoría de las larvas pasadas a semilla. A lo largo de estos días el TRB es el que mantiene un porcentaje de semilla más alta y el TRA el que tiene el menor porcentaje.

Bacteriología

Al igual que se comentó en la primera parte de la prueba la cantidad de CFU de bacterias marinas presentes en Marine Agar es mayor que en TCBS. Observando los porcentajes de bacterias del género *Vibrio* sp. de la tabla XXXV, vemos que el TRC es el tanque que presenta el porcentaje más alto. Si comparamos este dato con la supervivencia podemos ver que durante este período en el que se ha calculado el porcentaje, es el tanque que tiene una supervivencia más baja. El TRA presenta mayor porcentaje que el TRB, pero al compararlo con la gráfica de la supervivencia vemos que TRA es el que tiene una supervivencia más alta.

Tabla XXXV.- Bacteriología

Día	TANQUES		
	TRA	TRB	TRC
12.07.11	0,00%	0,00%	
13.07.11	0,00%	0,00%	
14.07.11	0,00%	< 0,02%	
15.07.11	< 0,01%	< 0,01%	
16.07.11	1,67%	0,00%	3,33%
17.07.11	0,01%	0,02%	< 1,29%
19.07.11	0,00%	0,00%	< 0,02%
20.07.11	< 0,13%	< 0,11%	< 0,26%
21.07.11	< 0,24%	< 0,06%	< 2,49%
22.07.11	< 0,14%	< 0,12%	< 2,14%
23.07.11	< 0,03%	< 0,02%	< 3,80%
PROMEDIO	< 0,20%	< 0,03%	< 1,90%

2.4.1.4. Línea 4. Preengorde de semilla

Una vez concluida la fase de fijación, la semilla permanece en los mismos tamices preengordando hasta que alcanza la talla adecuada para ser trasladada a el exterior. Distinguimos dos tipos de preengorde, en criadero y en el exterior.

2.4.1.4.1. Preengorde en criadero

El preengorde de semilla en criadero se realiza en taques de fibra de vidrio de 1.000 L de capacidad con circuito cerrado de agua y recirculación mediante flushing (Figura 64).

El agua es tratada con luz UV y filtrada por cartuchos de hasta 5 µm. Los cambios se realizan los lunes, miércoles y viernes y el alimento suministrado se realiza *ad libitum*, en función de la demanda requerida por los ejemplares. La semilla se deposita sobre tamices de 400 mm de Ø y con luz de maya adecuada al tamaño de estas. Por regla general, se dispondrán siempre en un tamiz inmediatamente inferior al que quedan retenidas en los muestreos para asegurar el asentamiento de aquellas inferiores que no hayan sido tamizadas correctamente.



Figura 64.- Tanque de 1.000 L de preengorde de semilla en criadero.

Se lleva a cabo hasta que la semilla queda retenida en tamices de 2-3 mm momento en que, debido a la cantidad de alimento que consume y al espacio que ocupa, es aconsejable su traslado al exterior hasta que alcance la talla de 8-10 mm que es el tamaño con el que se realiza la repoblación.

El tiempo de duración de esta fase varía entre los 60 días (“cabezas” o ejemplares que presentan un crecimiento más acelerado) y los 300 días (“colas” o individuos con crecimiento ralentizado).

Actualmente se dispone de unas 300.000 unidades que quedan retenidas en tamiz 1.000 y 2.000, a la espera de ir trasladándolas al sistema de preengorde en el exterior.

También, y debido a la sobreproducción en el año 2011, en esta fase se han cedido al CIMA de Ribadeo unos 3 millones de unidades.

Se considera como idónea la densidad de 250.000 unidades por tamiz para la fijación y, posteriormente, 200-250 g por tamiz hasta alcanzar la talla en que quedan retenidas en malla de 2-3 mm. En estas condiciones alcanzan supervivencias elevadas, en torno al 100%, y entre 60-300 días hasta alcanzar talla de tamiz 2-3 mm.

2.4.1.4.2. Preengorde en el exterior

Cuando la semilla en criadero alcanza la talla en la que queda retenida en tamiz de 2-3 mm se traslada a sistema de preengorde en el exterior.

Hasta el año 2009, este tipo de preengorde se realizó en sistema sobreelevado, con sacos de distinta luz de malla según el tamaño de la semilla. Este sistema requería de un mantenimiento minucioso en donde los sacos debían de ser volteados periódicamente o eran cambiados cuando la malla se iba tupiendo. También, la densidad de cultivo debía de ser baja para evitar mortalidades, por lo que la superficie ocupada era muy elevada, impidiendo realizar una producción numerosa de ejemplares.

En este mismo año, se construyó una batea en la que se colocaron tanques de flujo invertido (Figura 65) que permiten aumentar la densidad de semilla y reducir el mantenimiento.



Figura 65.- Batea situada en el dique de Figueras, detalle de la semilla albergada en el tanque e inmersión del tanque en el medio.

Una experiencia desarrollada para comparar ambos métodos ofreció resultados muy similares en cuanto a crecimiento y supervivencia. Se optó por el sistema de preengorde en tanques de flujo invertido ya que posibilita trabajar a mayor densidad y resultar más cómodo el manejo de la semilla hasta talla de siembra.

Con este sistema se han logrado supervivencias entre el 70 y el 90%, precisando la semilla entre 180 y 360 días desde que se aloja en este sistema hasta que llega a talla de 10-12 mm, cuando es liberada al medio para la siembra.

Actualmente se dispone de unas 600.000 unidades preengordando en este sistema a la espera de que, en la primavera del 2012, comiencen los primeros ejemplares a llegar a la talla de siembra.

También, de una de las puestas del 2010, se dispone de 5.600 unidades de unos 14 mm de talla y que pesan un total de 2 kg que se esperan mantener hasta que alcancen una talla de 20-30 mm con el fin de comprobar la viabilidad del preengorde en este sistema hasta estas tallas.

El sistema de flujo invertido permite aumentar la producción y disminuir el mantenimiento. Las cargas con las que se trabaja son de entre 1,5 y 3 kg de semilla por tanque de polietileno. En estas condiciones se han logrado supervivencias entre el 70 y el 90%, precisando la semilla entre 180 y 360 días

hasta alcanzar la talla de 10-12 mm, considerada adecuada para su liberación en el medio (reproducción).

Se dispone de 900.000 unidades en etapa de preengorde para ser repobladas en el verano de 2012.

2.4.2. SUBPROYECTO 2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BANCOS NATURALES Y DE LOS STOCKS DE CULTIVO DE LA ALMEJA

2.4.2.1. Identificación de loci microsatélite polimórficos

La amplificación en *R. philippinarum* de los nueve loci microsatélite descritos por Yasuda *et al.* (2007) generó en algunos individuos un producto del tamaño esperado en todos los loci, excepto uno. En *R. decussatus*, a pesar de los intentos de optimización, se obtuvieron amplificaciones positivas en cinco loci y sólo dos mostraron el tamaño esperado. Al analizar la variación de estos loci en las poblaciones naturales, un locus resultó monomórfico y el otro mostró seis alelos, pero los resultados fueron inconsistentes por la baja repetitividad de las amplificaciones. Por tanto, se descartó la utilización de ambos loci.

La genoteca enriquecida en ATC constó de 800 colonias recombinantes. Al hibridar con la sonda (ATC)₇, 519 mostraron hibridación positiva y se obtuvo la secuencia para 174 clones. De éstos, 81 contenían secuencias microsatélites y se pudieron diseñar cebadores para 65 de ellas. Al analizar el polimorfismo, 24 loci resultaron polimórficos.

La genoteca enriquecida en el tetranucleótido CTGT constó de 700 colonias recombinantes, secuenciándose un total de 217 clones. Entre las secuencias obtenidas se identificaron 32 con motivos microsatélite. Se diseñaron 24 parejas de cebadores y el análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa, reveló que uno de los pares de cebadores produce un patrón polimórfico, pero los pares restantes no produjeron amplificaciones satisfactorias. Aunque el tetranucleótido CTGT fue más abundante que otros motivos, la obtención de un bajo número de clones con este motivo hace pensar que pueda encontrarse con baja frecuencia en el genoma. Por otra parte, en las secuencias con microsatélite identificadas las regiones flanqueantes mostraron un elevado contenido en AT, dificultando el diseño de cebadores y la optimización de las reacciones de PCR.

La Tabla IV recopila los 25 loci microsatélite polimórficos identificados a partir de las genotecas construidas.

Tabla XXXVI.- Loci microsatélite polimórficos identificados.

Locus	Motivo microsatélite
RATC22	(ATG)4ACG(ATG)8
RATC28b	(TGC)4..... (TGG)3
RATC125	(ATC)9
RATC144	(TGA)3TGG(TGA)4
RATC160	(GAT)3(GAG)3...(GAT)5
RATC171	(AT)9TTA(GAT)3GCAGT(GA)3TGGT (GAT)3GGT(GAT)2
RATC177	(ATT)7ATG(AAG)2AGG(ATT)2AATAGT (ATT)2(ATC)16
RATC185	(TGA)2(TGT)3(TGA)7
RATC199	(AAAG)3... (ATG)13
RATC211	(ATG)14
RATC212b	(ATG)4... (ATG)11
RATC215	(TGT)5TAT(TGT)2(TGA)3AGATGG(TGA)3TGGCGG(TGG)2(TGA)9
RATC219	(TGA)4...(TGA)2GAATGACAG(TGA)5... (TGA)3TCA(TGA)5
RATC223	(ATG)7
RATC229	(CAT)6CAAGAACAACAA(CAT)4
RATC238	(ATG)14
RATC198	(GAT)5
RATC227	(TCA)11
RCTGT181	(GACA)GACG (GACA)3
RATC263	(TGA)3TCA(TGA)6T(TGA)2TAA(TGA)4ATA(AGA)3(TGA)3AGAGGG(GGA) 4(CG A)3
RATC156	(ATG)11
RATC15	(CAT)9(CAA)7
RATC119	(TGA)10
RATC134	(ATG)5G(ATG)2G(ATG)10(ATT)7
RATC179	(GAT)14

2.4.2.2. Optimización de PCR múltiplex

Con el fin de reducir el coste del análisis de los marcadores microsatélite, se trataron de optimizar PCR múltiplex que permitiesen amplificar varios marcadores, en una reacción de PCR. Se valoraron distintas agrupaciones de los 25 marcadores, propuestas por el programa Múltiplex Manager 1.0 (Holleley y Geerts, 2009), seleccionándose dos, una que incluía 10 marcadores y otra 9. Tras realizar varios ensayos (eliminando algunos marcadores y sustituyéndolos por otros) se consiguió la amplificación simultánea de 8 loci (RdM8) por un lado y de 6 por otro (RdM6). La múltiplex RdM8 incluye los loci RATC125; RATC134; RATC177; RATC179; RATC212; RATC215; RATC22 y RATC28B y la múltiplex RdM6 los loci RATC185; RATC199; RATC219; RATC223; RATC238 y RATC263 (Fig. 66 y 67).

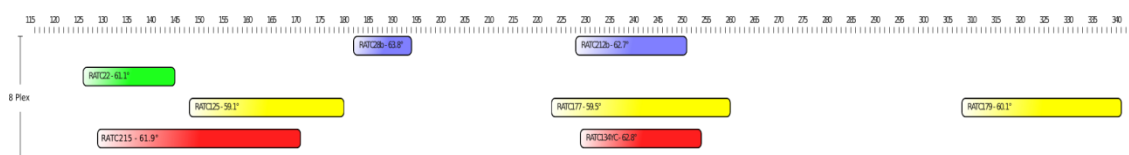


Figura 66.- Representación esquemática del rango alélico de los microsatélites amplificados en la multiplex RdM8.

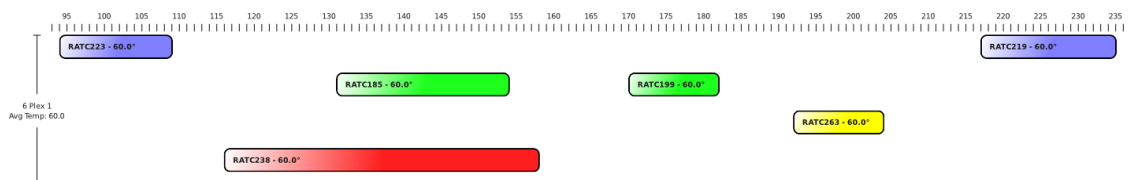


Figura 67.- Representación esquemática del rango alélico de los microsatélites amplificados en la multiplex RdM6.

2.4.2.3. Caracterización de los bancos naturales mediante marcadores microsatélite

La caracterización genética de los bancos naturales se llevó a cabo empleando tanto marcadores microsatélite como marcadores basados en RFLPs de intrones (ver más adelante). Haciendo uso de las dos PCR múltiplex optimizadas, se examinaron 14 loci en cada una de las localidades objeto de estudio.

Variabilidad genética

La tabla XXXVII muestra los resultados de los análisis de la variabilidad genética por locus, población y global para los 14 loci microsatélite analizados. El número de alelos por locus varió entre 6 (RATC28B) y 18 (RATC215) y la riqueza alélica entre 3,641 (RATC219) y 12,950 (RATC215). En las localidades, el número medio de alelos por locus fue de 7,571 a 8,714 y la riqueza alélica por locus de 7,102 a 8,227, observándose el menor valor en Cambados y el mayor en Delta del Ebro. Todas las localidades excepto Pontejos, Villaviciosa y Río Piedras mostraron alelos exclusivos, pero en baja frecuencia (<2,5%). La heterocigosidad media observada y esperada varió de 0,614 (Cambados) a 0,701 (Pontejos) y de 0,629 (Río Piedras) a 0,729 (Delta del Ebro), respectivamente. El test de Friedman indicó que la riqueza alélica (Friedman chi-cuadrada = 15,461, gl = 8, P-valor = 0,051) y heterocigosidad esperada (Friedman chi-cuadrada = 9,742, gl = 8, P-valor = 0,284) de las localidades no difieren significativamente. Así puede considerarse que el nivel de variabilidad genética es similar en todas las localidades, si bien en la variación observada, Cambados muestra mayoritariamente los valores más bajos y Delta del Ebro los más altos.

El análisis del desequilibrio de ligamiento indicó una asociación no aleatoria entre los alelos de los loci RATC22 y RATC199 en todas las localidades muestreadas, lo que sugiere que estos loci están ligados y se encuentran próximos en el genoma.

Las proporciones genotípicas de 109 de las 126 combinaciones locus-localidad no mostraron diferencias significativas con respecto a lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg para un $P \leq 0,05$. Tras la corrección secuencial de Bonferroni sólo cinco combinaciones fueron significativas. Todos los loci, excepto tres, se ajustaron a lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg en todas las localidades. Los que no lo hicieron mostraron desviaciones significativas en una (RATC219 y RATC22 en Delta del Ebro) o tres (RATC238 en Cambados, Redondela y Delta del Ebro) localidades. En todos los casos, las desviaciones se debieron a un déficit en el número de heterocigotos respecto a lo esperado, como indica el valor positivo del estadístico FIS. El programa Microchecker sugirió la existencia de alelos nulos en las combinaciones locus-localidad con déficit de heterocigotos en frecuencias de 0,143 a 0,221.

Tabla XXXVII.- Análisis de la variación genética de 14 loci microsatélite en nueve localidades (Carasa, Car; Pontejos, Pon; Villaviciosa, Vil; Eo, Eo; Cambados, Cam; Redondela, Red; Isla Cristina, Isl; Río Piedras, Río; Delta del Ebro, Del).

Locus		Car	Pon	Vil	Eo_	Cam	Red	Isl	Rio	Del	Global
RATC12 5	N	56	54	46	46	58	52	48	52	56	
	N A	8	8	10	6	8	7 (1)	7	9	10	11
	R s	7.518	7.624	9.951	6	7.942	6.801	6.827	8.231	9.776	8.612
	H o	0.625	0.759	0.609	0.783	0.690	0.635	0.646	0.654	0.875	
	H e	0.688	0.701	0.682	0.708	0.697	0.647	0.626	0.609	0.831	
f	0.092	- 0.084	0.109 *	- 0.107	0.010	0.020	- 0.032	- 0.075	- 0.075	- 0.053	-0.014
RATC13 4	N	56	55	44	46	58	52	48	53	55	
	N A	9	9	8	8	10	10 (1)	8	9	7	11
	R s	8.571	8.96	8	8	9.272	9.692	7.994	8.798	6.96	8.747
	H o	0.821	0.800	0.864	0.652	0.707	0.769	0.688	0.887	0.709	
	H e	0.845	0.833	0.826	0.812	0.789	0.836	0.788	0.828	0.767	
f	0.028	0.039	- 0.046	0.198	0.105	0.080	0.129	- 0.071	0.071	0.076	0.058
RATC17 7	N	56	55	46	44	58	52	48	53	56	
	N A	12 (1)	12	11	13 (1)	11	12	13	12	13	15
	R s	11.311	11.554	10.913	13	10.448	11.384	12.909	11.817	12.507	12.343
	H o	0.732	0.836	0.870	0.841	0.845	0.885	0.771	0.774	0.839	
	H e	0.865	0.865	0.869	0.871	0.847	0.859	0.895	0.888	0.866	
f	0.154 *	0.033	0.000	0.035	0.002	- 0.030	0.140	0.130	0.130	0.031	0.056

Locus		Car	Pon	Vil	Eo	Cam	Red	Isl	Rio	Del	Global
RATC17 9	N	56	55	46	46	58	51	48	53	54	
	N A	12 (1)	11	12	10	11	13	13 (1)	13	13	16
	R s	11.51 6	10.75 2	11.86 9	9.954	10.90 9	12.41 5	12.66 6	12.46 2	12. 22	11.674
	H o	0.786	0.691	0.913	0.826	0.862	0.863	0.896	0.943	0.8 33	
	H e f	0.837 0.062	0.791 0.128	0.798 - 0.146	0.842 0.019	0.837 - 0.030	0.831 - 0.039	0.890 - 0.007 *	0.876 - 0.078	0.8 34 0.0 00	-0.008
RATC18 5	N	59	57	55	53	67	65	49	62	70	
	N A	6	5	5	7	7	6	6	5	4	8
	R s	5.616	4.493	4.561	6.459	5.588	5.248	5.879	4.952	3.6 29	5.086
	H o	0.305	0.281	0.346	0.283	0.269	0.385	0.367	0.468	0.4 71	
	H e f	0.339 0.100 *	0.252 - 0.117	0.299 - 0.156	0.275 - 0.031	0.301 0.108	0.436 0.118	0.343 - 0.073	0.402 - 0.164	0.5 28 0.1 07	0.008
RATC19 9	N	59	58	55	53	67	64	48	62	68	
	N A	7	7	6	7	6	8	7	7	8	9
	R s	6.859	6.699	5.799	6.968	5.655	7.346	6.904	6.604	7.4 68	6.979
	H o	0.814	0.828	0.800	0.717	0.657	0.656	0.750	0.645	0.8 24	
	H e f	0.775 - 0.051	0.763 - 0.085	0.728 - 0.099	0.738 0.029	0.731 0.102	0.761 0.139	0.695 - 0.080	0.649 0.005	0.7 79 - 0.0 58	-0.007

Locus		Car	Pon	Vil	Eo_	Cam	Red	Isl	Rio	Del	Global
RATC21 2	N	56	55	46	46	58	52	48	53	56	
	N A	7	8	7	7	7	8 (1)	9	8	8	10
	R s	6.777	7.399	6.955	6.956	6.758	7.667	8.744	7.629	7.786	7.381
	H o	0.750	0.836	0.761	0.761	0.638	0.827	0.750	0.774	0.768	
	H e	0.729	0.776	0.734	0.733	0.750	0.724	0.744	0.744	0.809	
	f	- 0.029	- 0.079	- 0.038	- 0.039 *	0.150 *	- 0.144	- 0.008	- 0.040	0.0	52*
RATC21 5	N	56	55	46	46	58	46	47	53	54	
	N A	13	15	13	12 (1)	12	13	13 (1)	13	15	18
	R s	12.47	14.10 7	12.86 7	11.90 9	11.34 7	12.86 9	12.86 9	12.79 4	14.404	12.95
	H o	0.929	0.873	0.913	0.804	0.879	0.913	0.915	0.906	0.833	
	H e	0.854	0.872	0.869	0.861	0.855	0.844	0.897	0.899	0.893	
	f	- 0.088	- 0.001	- 0.052	0.066 *	- 0.029	- 0.082	- 0.020	- 0.007	0.0	67
RATC21 9	N	59	58	55	53	66	63	45	59	68	
	N A	2	4	3	4	3	3	3	2	6 (2)	8
	R s	2	3.517	2.8	3.66	2.965	2.698	2.978	2	5.481	3.641
	H o	0.373	0.586	0.400	0.377	0.530	0.444	0.356	0.356	0.324	
	H e	0.428	0.467	0.437	0.428	0.477	0.416	0.354	0.317	0.582	
	f	0.129	- 0.257	0.084	0.120	- 0.112	- 0.069	- 0.004	- 0.126	0.4	46*

Locus		Car	Pon	Vil	Eo_	Cam	Red	Isl	Rio	Del	Global
RATC22	N	56	55	46	46	57	52	48	52	55	
	N A	7	7	7	9	6	8	8 (1)	7	8	10
	R s	6.938	6.799	7	8.912	5.77	7.689	7.827	6.821	7.7 15	7.783
	H o	0.768	0.782	0.739	0.652	0.684	0.596	0.792	0.596	0.4 18	
	H e	0.777	0.771	0.753	0.775	0.720	0.756	0.704	0.671	0.7 13	
	f	0.011	- 0.014	0.018	0.160 *	0.050	0.213	- 0.126	0.112	0.4 15*	0.095
RATC22 3	N	58	60	55	53	68	65	50	62	70	
	N A	6	6	6	7 (1)	7	6	7 (1)	4	7 (1)	11
	R s	5.461	5.397	5.593	6.490	6.044	5.644	6.627	3.835	5.8 84	6.016
	H o	0.483	0.483	0.491	0.528	0.353	0.508	0.480	0.242	0.4 57	
	H e	0.449	0.485	0.510	0.474	0.313	0.500	0.448	0.270	0.4 98	
	f	- 0.075	0.004	0.039	- 0.117	- 0.128	- 0.015	- 0.073	0.105	0.0 83	-0.016
RATC23 8	N	52	51	51	52	68	64	50	61	68	
	N A	10 (1)	10	10	9	8	9	11 (1)	10	9	13
	R s	9.692	9.708	9.69	8.689	7.524	8.467	10.52	9.625	8.2 89	9.296
	H o	0.769	0.784	0.726	0.577	0.559	0.391	0.840	0.771	0.5 59	
	H e	0.851	0.820	0.833	0.793	0.828	0.791	0.837	0.839	0.8 25	
	f	0.097	0.044	0.130 *	0.274 *	0.327 **	0.508 **	- 0.004	0.082	0.3 24*	0.210

Locus		Car	Pon	Vil	Eo_	Cam	Red	Isl	Rio	Del	Global
RATC26 3	N	56	54	55	53	69	61	48	59	70	
	NA	5	5	8	6	5	5	5	7	11 (3)	12
	RS	4.785	4.782	7.646	5.656	4.275	4.645	4.916	6.365	10.097	6.978
	Ho	0.732	0.759	0.673	0.604	0.580	0.459	0.542	0.458	0.643	
	He	0.658	0.690	0.679	0.672	0.520	0.531	0.585	0.467	0.766	
f	- 0.114	- 0.102	0.009	0.103	- 0.115	0.136	0.074	0.020	0.161	0.023	
RATC28 B	N	56	55	46	46	58	52	48	53	56	
	NA	3	5	4	6 (1)	5	3	4	5	3	6
	RS	2.786	4.561	3.913	5.826	4.928	2.846	3.988	4.802	2.956	4.069
	Ho	0.339	0.509	0.478	0.348	0.345	0.365	0.438	0.321	0.536	
	He	0.373	0.452	0.480	0.347	0.456	0.428	0.409	0.354	0.521	
f	0.092	- 0.128	0.004	- 0.002	0.245 *	0.148	- 0.072	0.093	- 0.029	0.040	
Todos	NA	7.643	8.000	7.857	7.929	7.571	7.929	8.143	7.929	8.714	
	RS	7.307	7.597	7.683	7.749	7.102	7.529	7.975	7.624	8.227	
	Ho	0.659	0.701	0.684	0.625	0.614	0.621	0.659	0.628	0.649	
	He	0.676	0.681	0.678	0.666	0.651	0.669	0.658	0.629	0.729	

N: número de individuos amplificados; NA: número de alelos; RS: riqueza alélica (basada en un tamaño de muestra mínimo de 44 individuos); Ho: heterozigosidad observada; He: heterozigosidad esperada; f: coeficiente de endogamia según Weir y Cockerham (1984); Test de ajuste a Hardy-Weinberg: (*) $P \leq 0.05$, (**) significativo después de la corrección secuencial de Bonferroni.

Diferenciación genética

Los análisis de diferenciación poblacional se llevaron a cabo con 13 loci. El locus RATC22 no fue considerado al encontrarse ligado a RATC199. El valor del estadístico FST fue significativamente distinto de cero (FST = 0,0259, P-valor < 0,001) indicando la existencia de diferenciación genética entre las localidades. Los valores FST por pares de localidades (Tabla XXXVIII) fueron de -0,002 a 0,079, siendo significativos 30 de los 36 valores para $P \leq 0,05$. Tras la corrección secuencial de Bonferroni siguieron siendo significativos 28 de ellos. El Delta del Ebro fue significativamente distinto al resto. Las localidades de Asturias y Cantabria no mostraron diferencias significativas entre sí pero sí lo hicieron con las demás localidades. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las localidades de Galicia ni entre las de Andalucía, pero al comparar localidades de ambas comunidades, las diferencias son significativas. Teniendo en cuenta la diferenciación máxima teórica para el nivel de variación observado y las directrices de Wright (1978), la diferenciación genética observada es baja entre Cantábrico-Galicia y Galicia-Andalucía y moderada entre Cantábrico-Andalucía pero alta entre Delta del Ebro y las demás localidades.

Tabla XXXVIII.- Valores FST por pares de localidades.

	Car	Pon	Vil	Eo_	Cam	Red	Isl	Rio
Pon	0.001							
Vil	0.001	0.000						
Eo_	0.001	0.004*	0.003					
Cam	0.017**	0.011**	0.015**	0.017**				
Red	0.016**	0.011**	0.015**	0.015**	0.004*			
Isl	0.026**	0.019**	0.020**	0.015**	0.012**	0.012**		
Rio	0.032**	0.030**	0.030**	0.021**	0.013**	0.014**	0.002	
Del	0.053**	0.043**	0.053**	0.060**	0.067**	0.065**	0.065**	0.079**

(*) $P \leq 0.05$, (**) significativo después de la corrección secuencial de Bonferroni.

Los árboles neighbor-joining elaborados en base a los valores FST (Fig. 68) o distancia genética de Nei (1978) (datos no mostrados) reflejan que Delta del Ebro es la localidad más diferenciada genéticamente y que las demás localidades se agrupan por regiones, Cantábrico, Galicia y Andalucía, siendo las de Galicia las más estrechamente relacionadas con las otras localidades atlánticas.

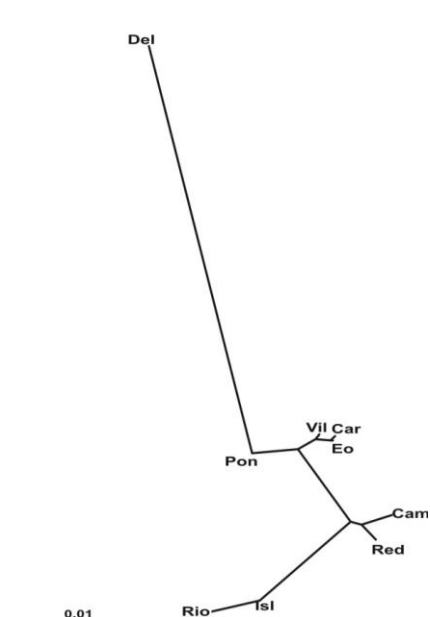


Figura 68.- Árbol neighbor-joining elaborado con los valores FST.

De los 469 tests de diferenciación alélica por pares de localidades fueron significativos 185 para $P \leq 0,05$ y 83 tras la corrección secuencial de Bonferroni. La mayoría de tests significativos (65) ocurrieron en comparaciones que incluían a la muestra de Delta del Ebro, la cual mostró diferencias en la frecuencia alélica de 6 a 10 loci con las demás localidades (Tabla XXXIX). Al igual que con el estadístico FST, las muestras de Asturias y Cantabria no mostraron evidencias de diferenciación genética. Tampoco se detectó diferenciación genética en las localidades de Andalucía ni en las de Galicia. Sin embargo Cantábrico y Andalucía muestran diferencias significativas en 1-2 loci. Las localidades de Galicia difieren en un locus de las del Cantábrico excepto en la comparación Cambados-Eo. Respecto a las localidades andaluzas, sólo Cambados y Río Piedras muestran diferencias significativas en un locus.

Tabla XXXIX.- Número de loci que muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pares de localidades.

	Car	Pon	Vil	Eo_	Cam	Red	Isl	Rio
Pon	0							
Vil	0	0						
Eo	0	0	0					
Cam	1	1	1	0				
Red	1	1	1	1	0			
Isl	2	1	2	1	0	0		
Rio	2	1	1	1	1	0	0	
Del	10	6	7	9	9	8	6	9

El test de Mantel reveló la existencia de una correlación significativa entre los valores de diferenciación y la distancia geográfica ($r = 0,7871$, $p = 0,0012$) cuando se analizaron en conjunto las nueve localidades (Fig. 69A). Al eliminar del análisis la localidad de Delta del Ebro (Fig. 69B), que representa la más alejada de todas ellas, el resultado del test de Mantel resultó de nuevo significativo ($r = 0,8936$, $p < 0,0001$). En ambos casos la correlación y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,620/0,798$) son relativamente altos, lo que indica que gran parte de la variación puede ser debida a un patrón evolutivo de aislamiento por distancia.

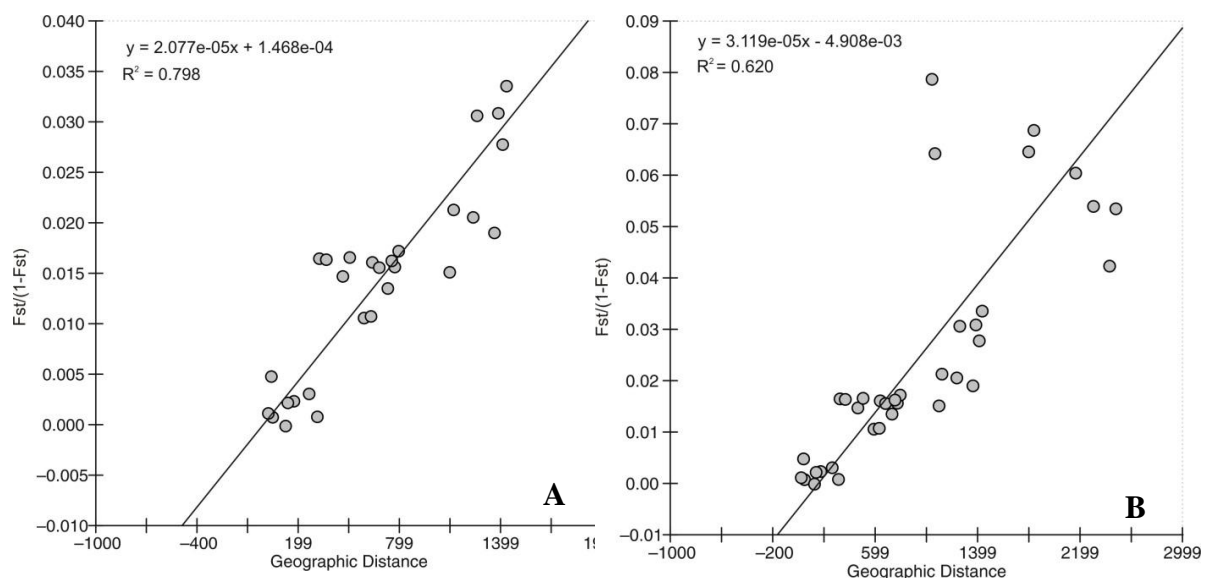


Figura 69.- Test de ajuste a un modelo de aislamiento por distancia considerando todas las localidades (A) y excluyendo Delta del Ebro (B). R^2 : coeficiente de determinación.

La diferenciación genética entre localidades analizada mediante un análisis factorial de correspondencias, se muestra en la figura 70. El resultado indica una clara separación de Delta del Ebro y Andalucía de las demás localidades.

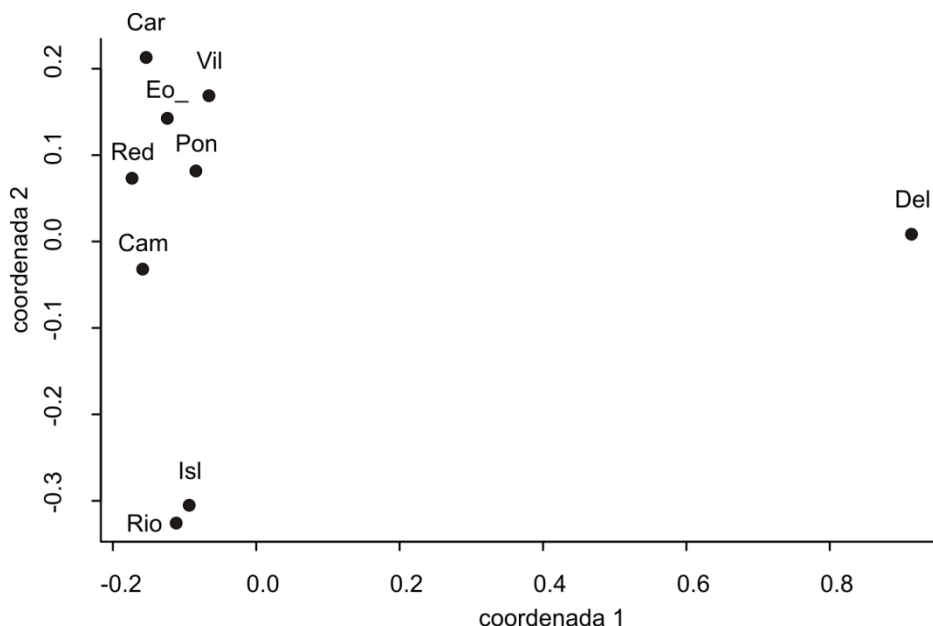


Figura 70.- Análisis factorial de correspondencias con nueve localidades examinadas.

Los resultados obtenidos usando el programa Structure bajo diferentes modelos fueron similares y confirmaron la existencia de diferenciación genética. Cuando se consideró que los individuos pueden tener un origen mixto, que es el modelo recomendado generalmente como punto de partida para el programa Structure, y asumiendo que las frecuencias alélicas están correlacionadas, se obtuvo que el número de grupos con mayor valor de ΔK fue 3. La figura 71 representa el resultado obtenido en una de las réplicas cuando se consideró la existencia de tres grupos (1, 2 y 3 representados en rojo, verde y azul, respectivamente) y la tabla XL la proporción en la que cada una de las muestras pertenece a cada uno de los 3 grupos. Uno de los grupos está claramente formado por los individuos de Delta del Ebro, donde predomina de forma notable el grupo 3. Igualmente, aunque de forma menos acusada, los individuos de las poblaciones de Andalucía también parecen formar otro grupo, ya que predomina el grupo 2. Finalmente, en el resto de localidades quedarían agrupadas en un tercer grupo, al mostrar proporciones variables del grupo 1 y 2.

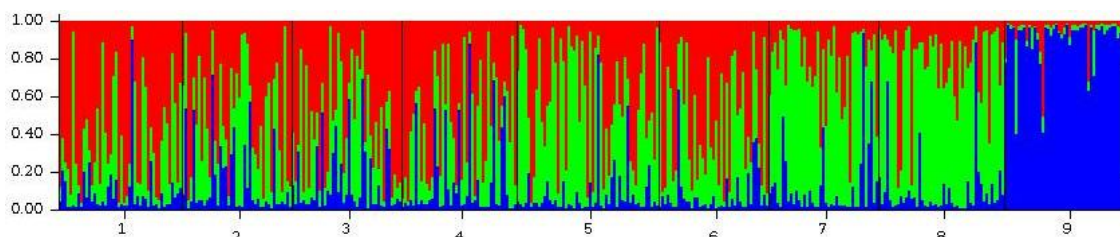


Figura 71.- Estructura poblacional inferida con el programa Structure. Cada individuo se representa mediante una barra vertical dividida en tres segmentos que se corresponden con su coeficiente de pertenencia a cada grupo. Cada color representa un grupo y las líneas negras separan los individuos de las distintas muestras. Los números corresponden a las poblaciones predefinidas: 1: Car; 2: Pon; 3: Vil; 4: Eo; 5: Cam; 6: Red; 7: Isl; 8: Rio; 9: Del.

Tabla XL.- Porcentaje de pertenencia de las muestras a cada grupo obtenido con el programa Structure.

Poblaciones	Grupos inferidos			Número de Individuos
	1	2	3	
Car	0,608	0,289	0,103	46
Pon	0,494	0,352	0,154	41
Vil	0,536	0,298	0,166	41
Eo	0,523	0,310	0,167	43
Cam	0,411	0,499	0,090	53
Red	0,532	0,373	0,095	41
Isl	0,224	0,646	0,130	41
Rio	0,230	0,667	0,103	57
Del	0,050	0,067	0,883	57

Para detectar niveles inferiores de estructura genética se repitió el análisis descrito anteriormente pero excluyendo la localidad más divergente, Delta del Ebro. Además se incluyó en el análisis el origen geográfico de los individuos, lo que facilita el agrupamiento en situaciones en que la diferenciación es relativamente débil (Hubisz *et al.*, 2009). De nuevo, el número más probable de grupos fue 3 (Fig. 72 y Tabla XLI), denominados en este caso A (rojo), B (verde) y C (azul). En los individuos de las muestras de Andalucía predominó el grupo C confirmando la existencia de diferenciación con respecto a las otras muestras Atlánticas. En el resto de localidades, el grupo mayoritario fue el A. No obstante, el hecho de que en los individuos de Galicia el grupo A muestre sus valores más bajos, junto con una presencia relativamente más elevada del grupo B, sugiere la existencia de cierta diferenciación entre las localidades del Norte de España.

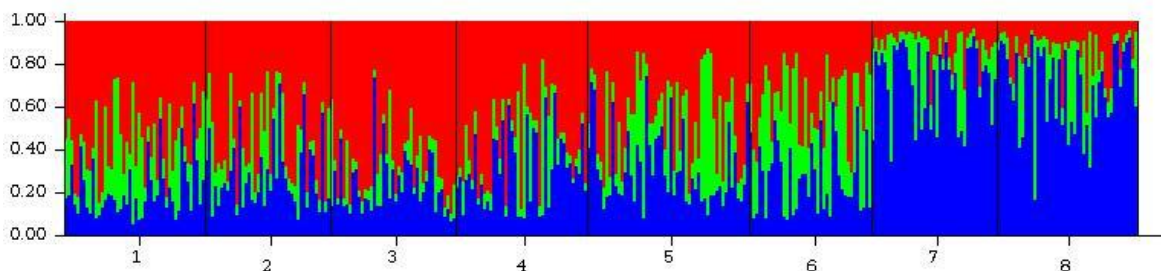


Figura 72.- Estructura poblacional inferida con el programa Structure excluyendo Delta del Ebro.

Tabla XLI.- Porcentaje de pertenencia de las muestras a cada grupo obtenido con el programa Structure, excluyendo Delta del Ebro.

Poblaciones	Grupos inferidos			Número de Individuos
	A	B	C	
Car	0,543	0,225	0,232	46
Pon	0,535	0,168	0,297	41
Vil	0,64	0,107	0,253	41
Eo	0,525	0,134	0,341	43
Cam	0,438	0,24	0,322	53
Red	0,362	0,331	0,307	40
Isl	0,09	0,156	0,753	41
Rio	0,119	0,159	0,723	46

Globalmente, los análisis realizados con marcadores microsatélite ponen de manifiesto la existencia de diferenciación genética significativa entre las localidades de Delta del Ebro, Andalucía, Galicia y Cantábrico, siendo la localidad mediterránea la más diferente genéticamente. La diferenciación observada puede ser debida en gran medida a la distancia geográfica que separa las localidades. Esto indica que, en caso de que la gestión del recurso requiera la transferencia de ejemplares, debería priorizarse el traslado a localidades próximas genéticamente más similares.

2.4.2.4. Caracterización de bancos naturales mediante marcadores basados en RFLPs de intrones

Variabilidad genética

Las frecuencias alélicas de los 6 marcadores en las 9 poblaciones estudiadas se presentan en la Tabla XLII. En esta tabla también se incluyen las frecuencias de alelos nulos estimadas mediante máxima verosimilitud para el marcador Ech.

La heterozigosis media en las poblaciones analizadas en este proyecto se presenta en la figura 73. En esta figura también se incluyen los datos para 6 poblaciones analizadas por Cordero *et al.* (2012) en un estudio anterior. En las poblaciones de este proyecto la heterozigosis (H) varió entre 0,394 y 0,482, y el número medio de alelos por locus lo hizo entre 2,33 y 2,67. En el estudio anterior de poblaciones de toda Europa (Cordero *et al.*, 2012) los valores extremos fueron 0,360 y 0,474 para la heterozigosis, y 2,16 y 3,00 para el número medio de alelos. Por lo tanto, los valores de heterozigosis observados en este trabajo se ajustan bien a los observados anteriormente. Cabe destacar que los valores más bajos de todo el conjunto de poblaciones se han obtenido en la población de Redondela en la Ría de Vigo. La figura 73 también presenta los valores del número medio de alelos por locus, con las mismas tendencias que la heterozigosis media.

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg fueron significativas en 15 casos, y todas menos una fueron positivas (Tabla XLI), lo que indica un déficit de heterocigotos. Los valores significativos se concentran especialmente en el locus Ech, que presenta alelos nulos (Cordero *et al.*, 2012). Como ya se ha dicho, las frecuencias de estos alelos se calcularon independientemente. En los demás marcadores los valores significativos están más dispersos, aunque también se observa un déficit conjunto significativo tras aplicar el test de Fisher ($X^2 = 158,09$, g.l. = 108, $P = 0,012$), que se acumula principalmente en el locus Srp54. Cinco poblaciones dieron test significativos para este marcador, y en cuatro casos fueron deficiencias de heterocigotos. Además, las deficiencias se acumularon en cuatro poblaciones, correspondientes a las Rías Bajas (Redondela y Cambados) y Golfo de Cádiz (Isla Cristina y Río Piedras). Estas poblaciones presentaron déficits significativos de heterocigotos en Srp54 y en un segundo marcador que difería de unas poblaciones a otras.

Tabla XLII.- Frecuencias alélicas, tamaños de muestra (N), y heterozigosis por locus (h) para los 6 marcadores en las 9 poblaciones estudiadas.

Marcador	Alelos	Población								
		CAR	PON	VIL	EO	CAM	RED	ISL	RIO	DEL
Ech	A	0,471	0,409	0,400	0,304	0,378	0,618	0,489	0,543	0,128
	B	0,324	0,205	0,210	0,250	0,081	0,074	0,170	0,086	0,782
	C	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,026
	Nulo	0,206	0,386	0,370	0,446	0,541	0,309	0,341	0,357	0,064
	N	34	44	50	46	37	34	44	35	39
	h	0,641	0,649	0,665	0,653	0,566	0,525	0,623	0,578	0,372
Fas	A	0,912	0,929	0,878	0,933	0,972	0,942	0,686	0,762	0,851
	B	0,088	0,071	0,122	0,067	0,028	0,058	0,314	0,238	0,149
	N	34	42	49	45	36	43	43	42	37
	h	0,163	0,134	0,217	0,126	0,055	0,111	0,436	0,367	0,257
Srp54	A	0,242	0,438	0,216	0,228	0,413	0,450	0,226	0,216	0,466
	B	0,500	0,417	0,534	0,565	0,478	0,483	0,643	0,689	0,431
	C	0,081	0,021	0,057	0,054	0,022	0,000	0,036	0,000	0,052
	D	0,177	0,125	0,193	0,152	0,087	0,067	0,095	0,095	0,052
	N	31	24	44	46	23	30	42	37	29
	h	0,664	0,632	0,635	0,609	0,606	0,569	0,532	0,476	0,603
Tbp	A	0,426	0,464	0,337	0,359	0,327	0,156	0,341	0,625	0,729
	B	0,574	0,536	0,663	0,630	0,673	0,844	0,659	0,375	0,271
	C	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	27	42	49	46	26	45	41	4	35
	h	0,498	0,503	0,451	0,479	0,449	0,266	0,455	0,536	0,401
Trdmt	A	0,667	0,821	0,780	0,722	0,294	0,267	0,705	0,731	0,342
	B	0,333	0,179	0,220	0,278	0,706	0,733	0,295	0,269	0,658
	N	30	42	50	45	34	45	44	39	38
	h	0,452	0,297	0,347	0,406	0,421	0,396	0,421	0,399	0,456
Ubc	A	0,643	0,756	0,771	0,714	0,743	0,856	0,713	0,631	0,710
	B	0,357	0,244	0,229	0,286	0,257	0,144	0,287	0,369	0,290
	N	21	43	48	42	35	45	40	42	31
	h	0,470	0,373	0,357	0,413	0,388	0,250	0,415	0,471	0,419

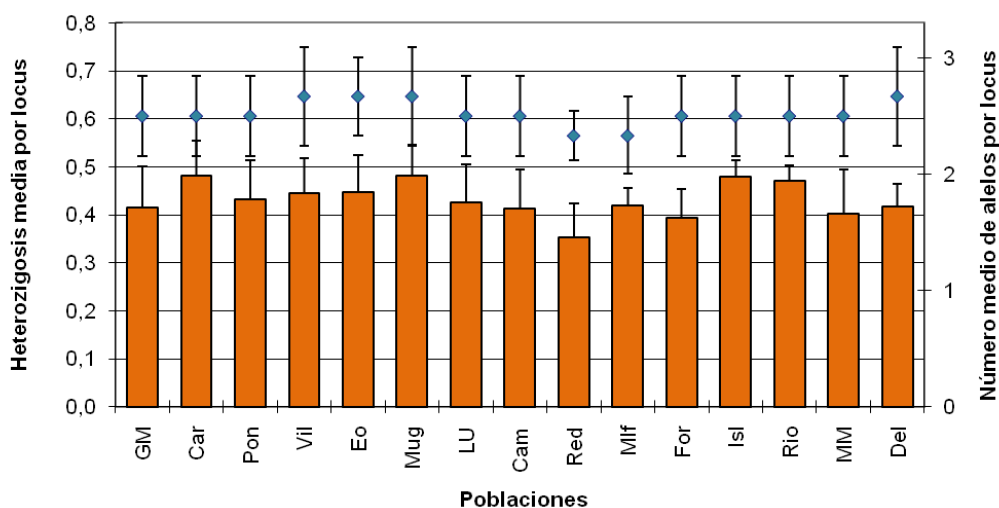


Figura 73.- Heterozigosis media por locus (barras) y número medio de alelos por locus (puntos) en las poblaciones de almeja fina.

Tabla XLIII. - Desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg por locus y por población (F_{IS}) con su significación (P), y resultados del test conjunto de ji-cuadrado de Fisher (X^2) para cada población. Para los test conjuntos se ha excluido el locus Ech. Los valores significativos se han resaltado en negrita.

Población	Marcador													
	Ech		Fas		Srp54		Tbp		Trdmt		Ubc		X^2	P
	F_{IS}	P	F_{IS}	P	F_{IS}	P	F_{IS}	P	F_{IS}	P	F_{IS}	P		
CAR	0,605	0,000	-0,082	1,000	-0,169	0,198	0,034	1,000	0,117	0,684	-0,117	0,665	4,83	0,902
PON	0,590	0,001	0,293	0,177	-0,191	0,029	-0,089	0,756	0,119	0,591	0,192	0,229	15,23	0,124
VIL	0,185	0,180	0,061	0,534	-0,039	0,546	0,051	0,758	-0,039	1,000	0,185	0,227	6,04	0,812
EO	0,908	0,000	-0,060	1,000	0,109	0,151	0,093	0,711	-0,041	1,000	0,195	0,258	7,36	0,691
CAM	0,525	0,032	1,000	0,015	0,214	0,035	0,058	1,000	0,023	1,000	-0,183	0,393	17,05	0,073
RED	0,553	0,010	-0,050	1,000	0,477	0,003	-0,004	1,000	0,441	0,006	0,022	1,000	22,65	0,012
ISL	0,626	0,000	-0,230	0,170	0,060	0,000	0,252	0,160	0,138	0,466	-0,270	0,127	28,93	0,001
RIO	0,569	0,000	-0,170	0,402	0,207	0,000	0,571	0,423	-0,095	0,694	0,041	1,000	Infinity	<0,001
DEL	0,529	0,001	-0,161	0,574	0,028	1,000	0,363	0,074	0,078	0,720	0,233	0,212	10,05	0,437
X2	17,76		19,63		74,82		12,36		14,97		18,55			
P	0,472		0,354		0,000		0,828		0,664		0,420			

Diferenciación genética

Los niveles de diferenciación genética para distintas áreas geográficas se presentan en la tabla XLIV. Para el conjunto de poblaciones se encontró una diferenciación geográfica moderada, con un valor total de FST de 0,088. El FST total se ve muy influido por la población mediterránea del Delta del Ebro. Al calcular los valores de FST excluyendo la población del Delta del Ebro, se observa una reducción del 35% (FST = 0,057). Dentro de las poblaciones atlánticas, hemos calculado los niveles de diferenciación en tres regiones: Cantábrico, Rías Gallegas, y SW peninsular (costa de Huelva). Los resultados indican que no hay diferencias genéticas significativas para los marcadores estudiados entre las 2 poblaciones del SW ni entre las 4 poblaciones del Cantábrico ($P > 0.05$), aunque las 2 poblaciones de las Rías Gallegas sí que presentan diferencias genéticas significativas entre sí.

Para incrementar el número de poblaciones y realizar inferencias más robustas sobre la diferenciación genética, hemos repetido las estimaciones de FST después de incorporar 6 poblaciones de la misma zona analizadas por Cordero *et al.* (2012) (Fig.74). Los resultados (Tabla XLIV) corroboran los descritos anteriormente, pero ahora se observa un valor significativo de FST entre las 4 poblaciones del SW de la Península. Este resultado indica que existen diferencias genéticas significativas entre las poblaciones del sur de Portugal y las de Huelva. En cualquier caso, estas diferencias son pequeñas (FST = 0,019). Por otra parte, no existe diferenciación significativa entre las poblaciones del Cantábrico tras incluir una muestra de la Bretaña francesa (Golfo de Morbihan).

Los marcadores presentaron valores de FST que variaron entre 0,010 (Ubc) y 0,194 (Trdmt) (Fig. 74). Cuando se excluye del cálculo la población del Delta del Ebro, se comprueba que el valor de FST cae apreciablemente en los marcadores Ech y Tbp (barras rojas en la Fig. 74). Este resultado indica que estos marcadores son los responsables de la diferenciación genética entre el Mediterráneo y el Atlántico.

Los valores de FST por parejas de poblaciones variaron entre 0 y 0,250 (Tabla XLV), y fueron altamente significativos en la mayoría de los casos. Tres poblaciones cantábricas (Eo, Villaviciosa y Pontejos) no presentaron diferencias significativas entre sí, y por lo tanto constituyen un grupo homogéneo, al igual que las dos poblaciones de Huelva (Isla Cristina y Río Piedras). Estos resultados corroboran los análisis de FST por regiones realizados anteriormente (Tabla XLVI), aunque la población cántabra de Carasa se desmarcó de las demás poblaciones cantábricas. Las poblaciones gallegas presentan valores de FST relativamente altos a pesar de estar relativamente próximas (0,023 entre Cam y Red, localizadas en rías vecinas, y 0,036 cuando se incluyen las poblaciones analizadas en un estudio anterior).

Los valores de FST entre pares de poblaciones no producen una correlación significativa en un modelo de aislamiento por la distancia ($r = 0,495$, $P = 0,094$) (Fig. 12). Cuando se añadieron al análisis 6 poblaciones del estudio de Cordero *et al.* (2012), se obtuvo una correlación significativa ($r = 0,488$, $P = 0,004$). Sin embargo, esta correlación es baja, y el coeficiente de determinación indica que sólo el 24% de la variación en frecuencias génicas se explica por la distancia

entre las poblaciones. Cuando se consideran solamente las poblaciones atlánticas, la correlación es casi cero ($r = 0,056$) y ya no es significativa ($P = 0,313$). Este resultado indica que el valor significativo anterior estaba determinado por la diferenciación que se da entre las poblaciones Atlánticas y las Mediterráneas, que son las más alejadas.

Tabla XLIV.- FST total y por regiones para las 9 poblaciones analizadas en este proyecto (A) y para las 15 resultantes de añadir 6 poblaciones de Cordero et al. (2012) (B). Se da el intervalo de confianza del 95% y la probabilidad (P) para la hipótesis nula de $FST = 0$.

Área	Número de Poblaciones	FST	95% I. C.	P
A				
Total	9	0,088	0,03758 – 0,13814	0,000
Atlántico	8	0,057	0,02289 – 0,11645	0,000
Mediterráneo	1	-	-	-
Cantábrico	4	0,006	0,00157 – 0,01018	0,081
Rías gallegas	2	0,028	-0,00873 – 0,06576	0,025
SW Península Ibérica	2	0,014	-0,00685 – 0,04979	0,212
B				
Total	15	0,094	0,04172 – 0,12881	0,000
Atlántico	13	0,054	0,02546 – 0,10426	0,000
Mediterráneo	2	0,046	0,01112 – 0,08567	0,003
Cantábrico	5	0,005	-0,00067 – 0,01131	0,097
Rías gallegas	4	0,036	0,01551 – 0,05481	0,000
SW Península Ibérica	4	0,019	0,00123 – 0,04651	0,007

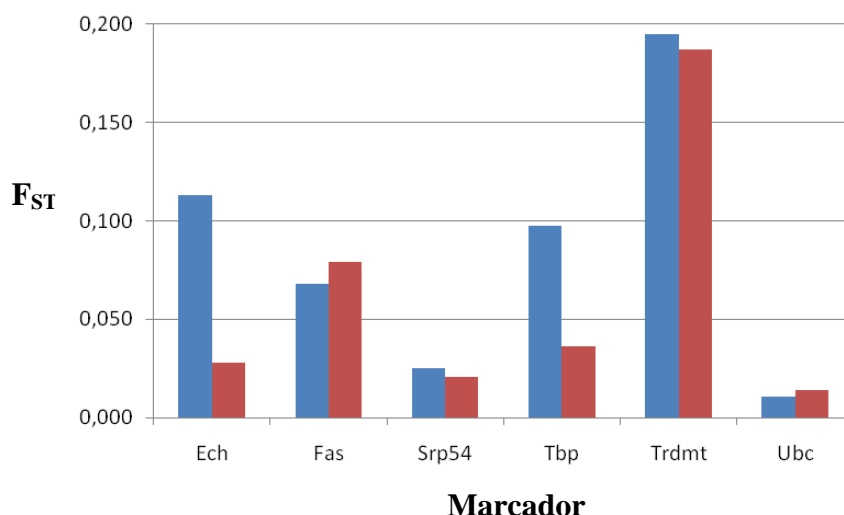


Figura 74.- Valores de FST para cada marcador calculados para el conjunto de todas las poblaciones (azul) y para las poblaciones atlánticas únicamente (rojo).

En conjunto, los resultados de los tests de aislamiento por la distancia indican que existen otros factores más importantes que la separación geográfica para explicar las diferencias entre poblaciones para los marcadores estudiados. Para determinar esos factores, llevamos a cabo un análisis detallado de las pautas de diferenciación geográfica y los agrupamientos geográficos de las poblaciones mediante diagramas de árbol basados en los valores de FST entre pares de poblaciones, análisis factorial de correspondencias y análisis bayesiano de estructura genética.

El árbol de distancias ha resultado ser una politomía con tres ramas divergentes. Una incluye sólo la población del Delta del Ebro (Fig. 75A), otra, las poblaciones de las Rías Gallegas (Cambados, Redondela), y una tercera incluye las poblaciones de la cornisa cantábrica. El resultado más llamativo de este análisis es que las dos poblaciones del Golfo de Cádiz (Isla Cristina, Río Piedras) son más similares a las poblaciones cantábricas que a las de las Rías Baixas o a las mediterráneas, situadas más cerca, y se agrupan con ellas en el diagrama de árbol. Cuando el análisis se realiza incorporando las poblaciones de Cordero *et al.* (2012), se confirma este resultado (Fig. 75B), con las poblaciones de Galicia y SW peninsular formando un grupo más diferenciado, que se conecta con las poblaciones del Mediterráneo a través de las poblaciones cantábricas.

El análisis factorial de correspondencias confirmó este diagnóstico. En este análisis tres componentes explican más del 80% de la variación de los datos, y el incremento de factores no aumenta significativamente la variación explicada. Estos tres componentes permiten observar un agrupamiento de las poblaciones del Cantábrico y del Golfo de Cádiz, y la separación de este grupo de las poblaciones de las Rías Gallegas y del Mediterráneo (Fig. 76).

El análisis bayesiano de estructura genética de las nueve poblaciones de este proyecto asignó los genotipos individuales a 3 clúster con la máxima probabilidad (Fig 77A). Uno de estos clúster se concentra en la población mediterránea del

Delta del Ebro, y los otros dos se distribuyen en proporciones distintas a lo largo de las costas de la Península, dando lugar a cuatro “zonas” en la gráfica. La primera incluye las poblaciones cantábricas, con predominio del clúster 1 (azul claro); la segunda zona incluye las poblaciones de las Rías Baixas, con predominio del clúster 2 (azul oscuro). La tercera incluye las poblaciones del sur de Portugal y de Huelva, de nuevo con predominio del clúster 1 y por lo tanto similares a las poblaciones cantábricas, como se veía en el diagrama de árbol. Y la última zona de la gráfica incluye las poblaciones mediterráneas, con predominio del clúster 3 (morado), y completamente diferentes de las demás. Lo más llamativo de este análisis es que las poblaciones gallegas son cualitativamente diferentes en su composición genética, de las poblaciones cantábricas y del SW de la Península, en concordancia con los análisis de correspondencias y el árbol de distancias.

Cuando se añadieron las 6 poblaciones de Cordero et al. (2012) para el análisis bayesiano de estructura genética, se encontró un $K=2$, que separa las poblaciones del Mediterráneo de todas las demás. Como este resultado es trivial (ya se conocía por el análisis anterior, y por el trabajo de Cordero *et al.*, 2012), repetimos el análisis excluyendo las poblaciones mediterráneas, para buscar subdivisiones genéticas en las poblaciones atlánticas y cantábricas. De nuevo obtuvimos $K=2$ (Fig. 78A). La distribución de los dos clúster define una zona de influencia mayoritariamente atlántica en torno a las Rías Gallegas, con el clúster 1 (azul claro) en alta frecuencia en las dos poblaciones de este estudio (Redondela en la Ría de Vigo y Cambados en la de Arousa) y una tercera población procedente del estudio de Cordero *et al.* (2012) (Lombos do Ulla en la Ría de Arousa). El clúster 1 desciende de frecuencia hacia el norte, en la Ría de Ferrol (población de Mugaros), y en las poblaciones del Sur de Portugal (Milfontes, en la costa Atlántica, y Ría Formosa en el Golfo de Cádiz). Finalmente el clúster 1 se hace muy poco frecuente en las poblaciones cantábricas y en las de la costa de Huelva, que muestran una gran similitud, como se había puesto de manifiesto en los otros análisis.

La contribución de los distintos marcadores a los clúster que permiten diferenciar las poblaciones atlánticas se presenta en la figura 79, donde se muestra la diferencia entre los dos clúster de las frecuencias de cada alelo. Para los marcadores bialélicos el valor de la diferencia es igual para los dos alelos. Se observa que el marcador Trdmt contribuye más que los otros, pero todos excepto Ubc contribuyen a la diferencia de los clúster. Esto indica que la diferencia entre, clúster y consecuentemente entre regiones geográficas, no es exclusivamente el producto de la diferenciación en Trdmt.

Tabla XLV. – Valores de FST por pares de poblaciones y significación estadística.

	GM	Car	Pon	Vil	Eo	Mug	LU	Cam	Red	Mlf	For	Isl	Rio	MM	Del
Car	0,0198*														
Pon	-0,0013	0,017													
VIL	-0,0034	0,008	0,006												
Eo	0,0002	0,009	0,009	-0,004											
Mug	0,0675***	0,010	0,059***	0,036***	0,033***										
LU	0,115***	0,072***	0,106***	0,075***	0,054***	0,038**									
Cam	0,137***	0,086***	0,110***	0,097***	0,073***	0,055***	-0,003								
Red	0,193***	0,119***	0,168***	0,134***	0,130***	0,073***	0,034***	0,028*							
Mlf	0,036***	0,042***	0,053***	0,015*	0,015*	0,023*	0,042**	0,064***	0,105***						
For	0,074***	0,046***	0,088***	0,043***	0,048***	0,012*	0,067***	0,095***	0,102***	0,011					
Isl	0,030***	0,022**	0,036***	0,011*	0,021***	0,024**	0,077***	0,098***	0,124***	0,008	0,031***				
Rio	0,036***	0,025***	0,038***	0,022**	0,029***	0,028***	0,098***	0,119***	0,153***	0,012*	0,022**	-0,001			
MM	0,116***	0,083***	0,100***	0,122***	0,102***	0,151***	0,162***	0,142***	0,231***	0,179***	0,215***	0,139***	0,108***		
Del	0,213***	0,129***	0,191***	0,199***	0,174***	0,176***	0,198***	0,191***	0,250***	0,249***	0,268***	0,192***	0,202***	0,051***	
Eb	0,218***	0,156***	0,212***	0,209***	0,182***	0,215***	0,224***	0,227***	0,293***	0,271***	0,294***	0,208***	0,220***	0,056***	0,005*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

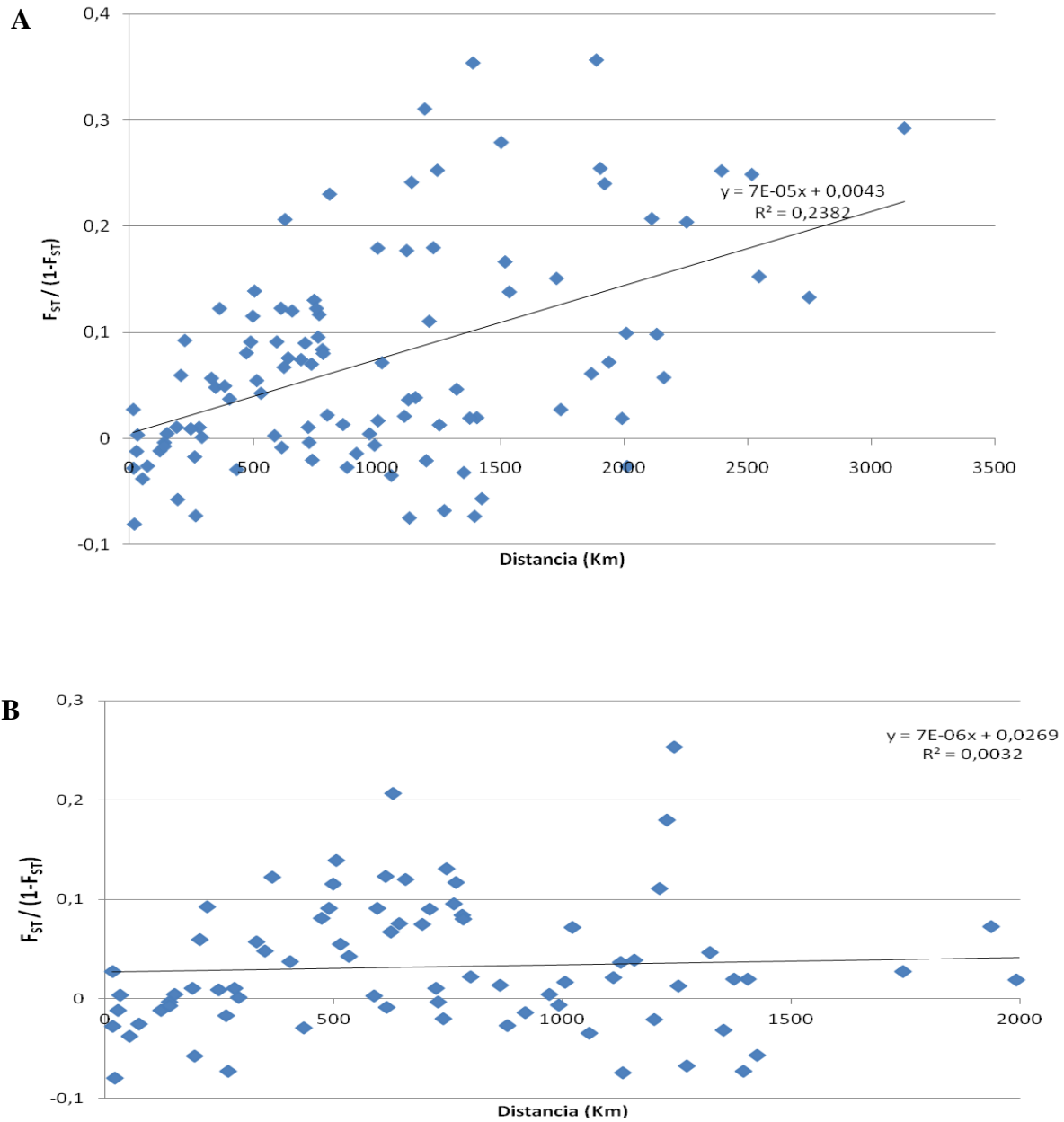


Figura 75.- Test de ajuste a un modelo de aislamiento por la distancia con las 9 poblaciones analizadas en este proyecto y 6 poblaciones adicionales estudiadas por Cordero et al. (2012). Se da el coeficiente de determinación (R^2). A: todas las poblaciones. B: sólo poblaciones atlánticas.

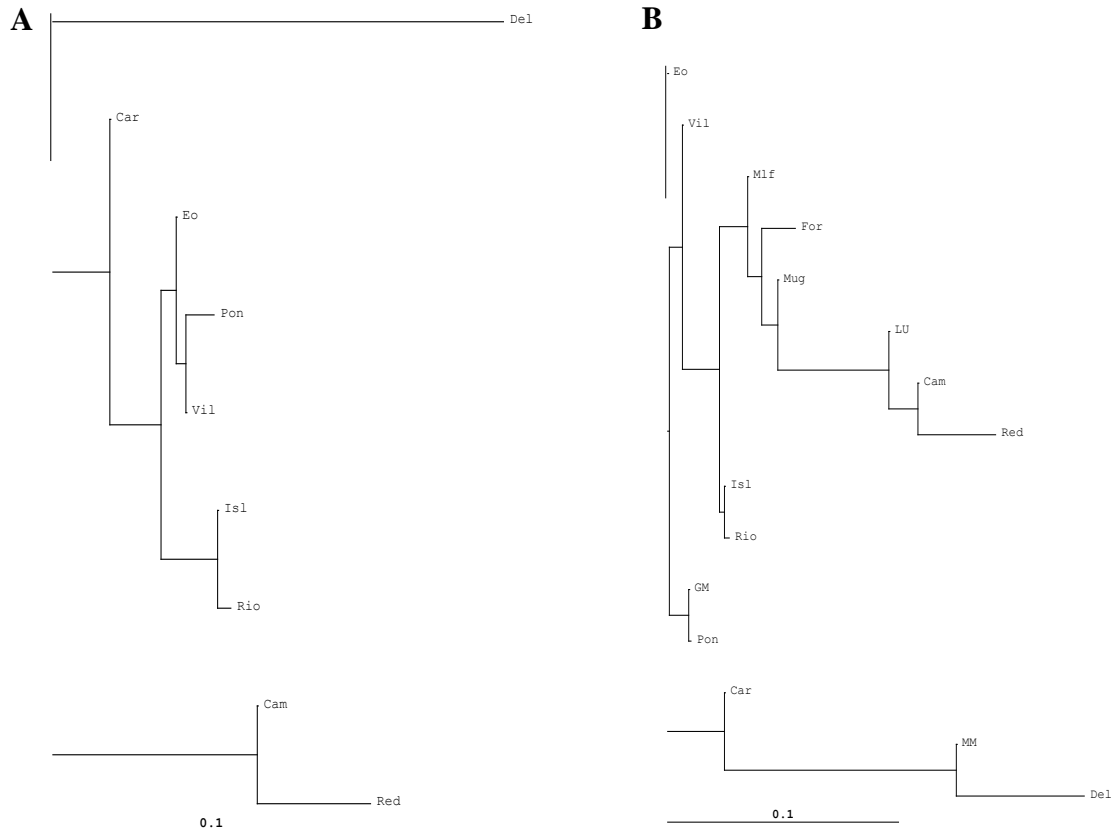


Figura 76.- Diagrama de árbol basado en el método de unión de vecinos con los valores de FST entre parejas de poblaciones para las 9 poblaciones estudiadas (A) y las 15 resultantes de añadir 6 poblaciones estudiadas por Cordero et al. (2012) (B).

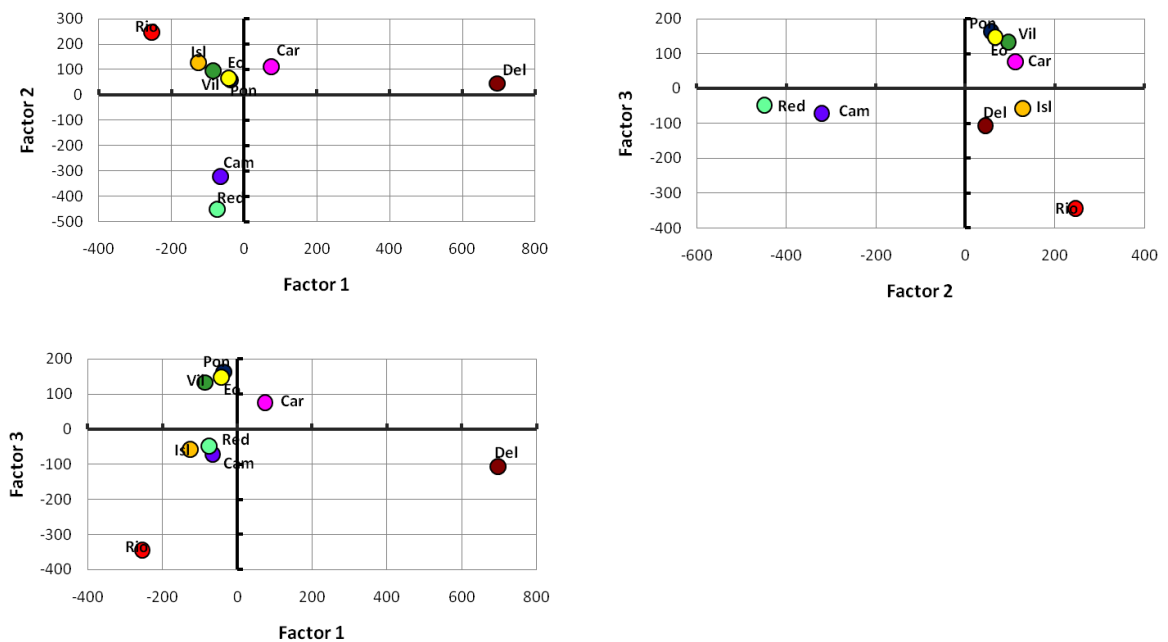


Figura 77.- Análisis factorial de correspondencias de las frecuencias génicas en las poblaciones de almeja fina. Los factores 1, 2, y 3 explican el 39,1 %, el 28,9 % y el 14,7 % de la variación, respectivamente.

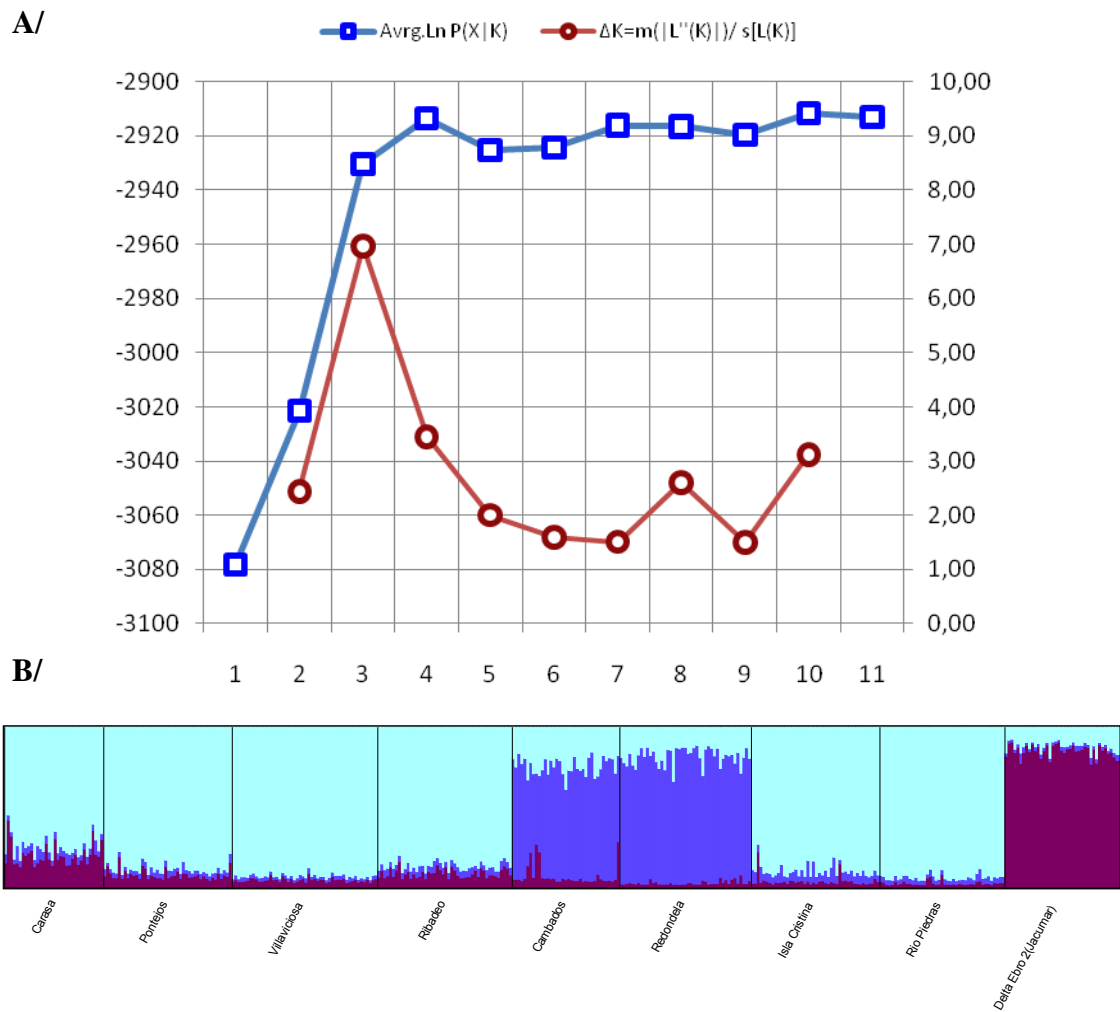
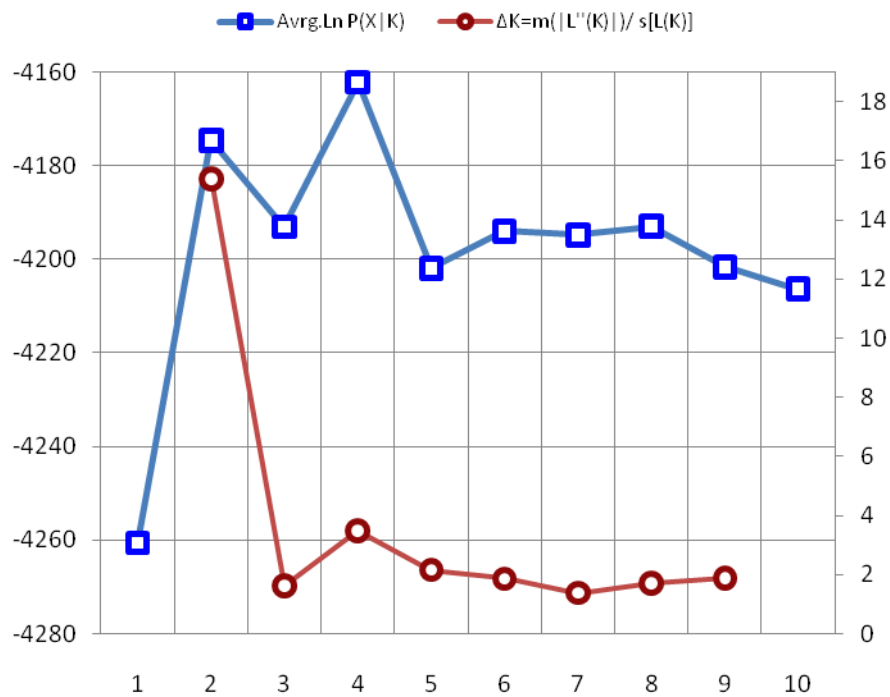


Figura 78.- Análisis bayesiano de estructura genética de las 9 poblaciones de este proyecto. A. El test de Evanno et al. (2005) para el número de clústers (K) más probable indica K=3. B. Distribución de los 3 clústers en las poblaciones; cada barra vertical representa un individuo.

A/



B/

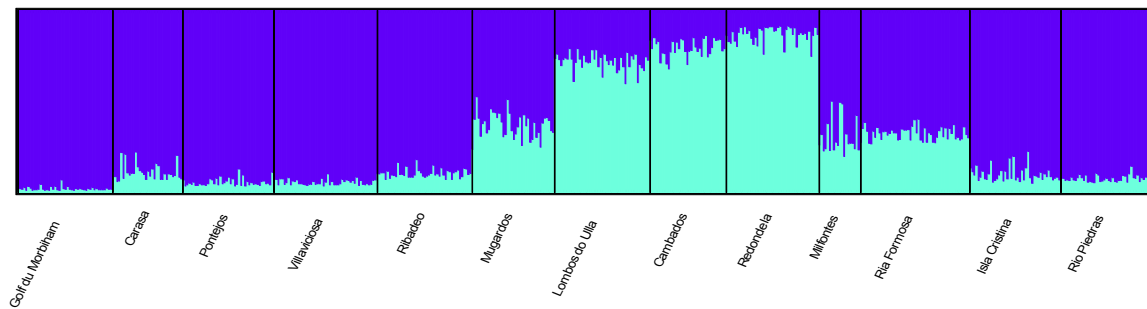


Figura 79.- Análisis bayesiano de estructura genética de las poblaciones de este proyecto, excluyendo la población mediterránea del Delta del Ebro, y añadiendo 4 poblaciones atlánticas del estudio de Cordero et al. (2012). A. El test Evanno et al. (2005) para el número de clústers (K) más probable indica $K = 2$. B. Distribución de los 2 clústers en las poblaciones; cada barra vertical representa un individuo.

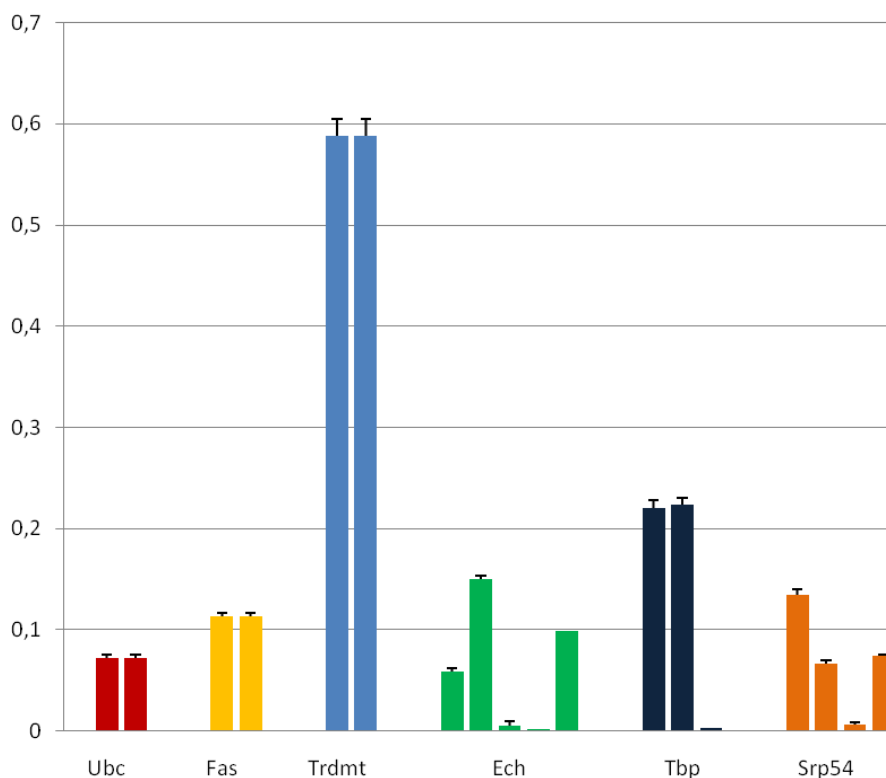


Figura 80.- Contribución de los alelos de los 6 marcadores a los clústers del análisis bayesiano de estructura genética de la figura 78. Se muestra el valor de la diferencia de la frecuencia de cada alelo en los clústers 1 y 2.

En esta parte del proyecto se ha abordado el estudio genético de los bancos naturales de almeja fina de relevancia marisquera de las costas españolas. Se han utilizado para ello dos tipos de marcadores genéticos: microsatélites y polimorfismos de intrones. Estos marcadores poseen características diferentes que los hacen sensibles a diferentes parámetros poblacionales. Los microsatélites son polimorfismos de longitud de secuencias repetidas, localizados mayoritariamente en las regiones no codificantes del genoma, y con tasas de mutación altas. Los intrones son secuencias no codificantes situadas en el interior de la parte codificante del genoma, que constituye menos del 3% del mismo. La variabilidad de estos marcadores procede fundamentalmente de sustituciones nucleotídicas sencillas (SNP) y en menor medida, de polimorfismo de inserción/delección de diversa longitud, con tasas de mutación varios órdenes de magnitud más bajas que los microsatélites. Como consecuencia de estas características, los microsatélites poseen mucha más variabilidad que los marcadores intrónicos. Sin embargo, son más sensibles a la homoplasia (aparición recurrente de una misma variante alélica) y recogen la historia poblacional en una ventana temporal más corta (miles a decenas de miles de generaciones) que los intrones (desde miles a millones de generaciones). Además, los polimorfismos de intrones podrían ser más sensibles que los microsatélites al efecto de la selección de fondo y a la selección positiva sobre secuencias próximas (hitchhiking), al encontrarse situados junto a secuencias

codificantes que podrían estar sometidas a la selección natural. La variabilidad de los microsatélites presentaría una dinámica más regulada por la interacción del flujo genético y los tamaños de población en épocas más recientes. En conjunto, los dos tipos de marcadores ofrecen un panorama muy rico sobre la genética de las poblaciones de la almeja fina, que abarca distintos tipos de procesos (variaciones del tamaño efectivo, flujo genético, subdivisión poblacional, selección de fondo y selección positiva), con la ventaja de que la comparación entre ambos tipos de marcadores facilita la interpretación de pautas complejas de variación.

En conjunto, todos los marcadores indican que la variabilidad genética de las poblaciones es muy similar, si bien los valores más bajos se obtienen en poblaciones de las Rías Baixas de Galicia. Con los tamaños de muestra utilizados y el número de marcadores empleado (que por otra parte son los habituales en este tipo de estudios) es difícil obtener significación estadística, a menos que las diferencias de variabilidad sean muy grandes. Por lo tanto no se puede excluir que esas poblaciones registren fenómenos específicos que tienden a disminuir la variabilidad, entre los cuales podrían incluirse factores relacionados con la gestión marisquera y la repoblación.

Otro aspecto en el cual coincide la información obtenida a partir de los dos tipos de marcadores es la existencia de niveles apreciables de diferenciación genética entre las poblaciones. Las mayores diferencias se observan entre las costas atlánticas y las mediterráneas. Las comparaciones entre las poblaciones de estas dos regiones alcanzan valores de diferenciación mayores del 20%, que son muy elevados para organismos marinos con fases larvianas planctónicas largas como las almejas.

Las demás poblaciones presentan una diferenciación mucho más baja (inferior al 10%), que suele ser mayor cuanto más alejadas están unas de otras. Sin embargo, el modelo de aislamiento por la distancia no explica completamente las diferencias observadas en los bancos de almeja fina de la Península Ibérica, y se detecta también una pauta de subdivisión genética regional: las poblaciones de la costa cantábrica, las poblaciones de las Rías Baixas (quizá extensible a la mayor parte de la fachada atlántica peninsular, como sugieren los intrones), y las poblaciones de la costa de Huelva manifiestan diferencias significativas entre sí de magnitud moderada.

Variabilidad y diferenciación genética en bancos naturales reproductores y semilla

Para evaluar los efectos genéticos de la cría en cautividad se cuantificó la variabilidad genética existente, tanto en los lotes de reproductores como en la semilla generada a partir de ellos y se comparó con la de los bancos naturales de donde proceden y que se repoblaron a partir de ella. La tabla XLVI muestra las estimas de variabilidad utilizando 14 loci microsatélites. La variabilidad de los lotes de reproductores es muy similar al de la población natural de la que proceden en todos los parámetros estimados. Sin embargo, en las muestras de semilla en general, se aprecia una menor variabilidad. Atendiendo a la riqueza alélica, por no depender del tamaño muestral, se observan reducciones del 9-21% respecto a los reproductores y del 10-21% respecto al banco natural.

Tabla XLVI.- Valores de variabilidad genética estimados en las muestras analizadas.

Localidad/muestra	N	NA	RS	Ho	He
Eo					
Banco natural	46	7,67	6,11	0,597	0,660
Reproductores	45	7,40	6,09	0,669	0,675
Semilla-Ma	94	5,53	4,83	0,632	0,608
Semilla-Ju	92	5,53	4,79	0,645	0,622
Villaviciosa					
Banco natural	46	7,47	6,03	0,669	0,668
Reproductores	19	6,13	6,05	0,613	0,653
Semilla	96	6,27	5,49	0,630	0,672
Sem-MEZ	88	5,73	5,14	0,638	0,661
Cambados					
Banco natural	69	7,57	6,94	0,614	0,651
Reproductores 1	40	7,36	7,31	0,635	0,667
Semilla 1	154	7,71	6,24	0,616	0,636
Reproductores 2	49	7,43	7,34	0,634	0,674
Semilla 2	148	6,57	6,09	0,620	0,632

N: nº individuos analizados; NA: nº medio de alelos por locus; RS: riqueza alélica (nº de alelos en función del tamaño de muestral menor-18); Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

Al analizar la estructura genética de las muestras de Asturias (Tabla XLVII) se observa que no existen diferencias significativas entre las muestras naturales y los stocks de reproductores derivados de ellos, ni entre las dos muestras de semilla procedentes de los reproductores del Eo, sin embargo sí existen diferencias significativas al comparar las muestras de semillas con los lotes de reproductores de los que proceden y las poblaciones naturales donde se siembran.

Tabla XLVII.- Valores del estadístico de diferenciación FST entre pares de muestras de Asturias.

	Rep-EO	Sem-EO-Ma	SEM-EO-Ju	Sem-VI-Ma	Sem-MEZ	Nat-VI	Nat-EO
Rep-VI	0,003	0,063	0,055	0,011	0,029	0,004	0,002
Rep-EO	0	0,048	0,036	0,011	0,021	0,002	0,001
Sem-EO-Ma		0	0,011	0,075	0,070	0,057	0,060
Sem-EO-Ju			0	0,065	0,070	0,052	0,050
Sem-VI-Ma				0	0,012	0,021	0,015
Sem-MEZ					0	0,035	0,023
Nat-VI						0	0,002

En negrita, valores que muestran diferencias significativas después de la corrección secuencial de Bonferroni.

Las diferencias detectadas en el parámetro FST se ven también reflejadas cuando se elabora un árbol filogenético (Figura 81) donde se observa que las muestras pertenecientes a las poblaciones naturales y lotes de reproductores se agrupan en un nodo separado de las muestras de semilla obtenidas.

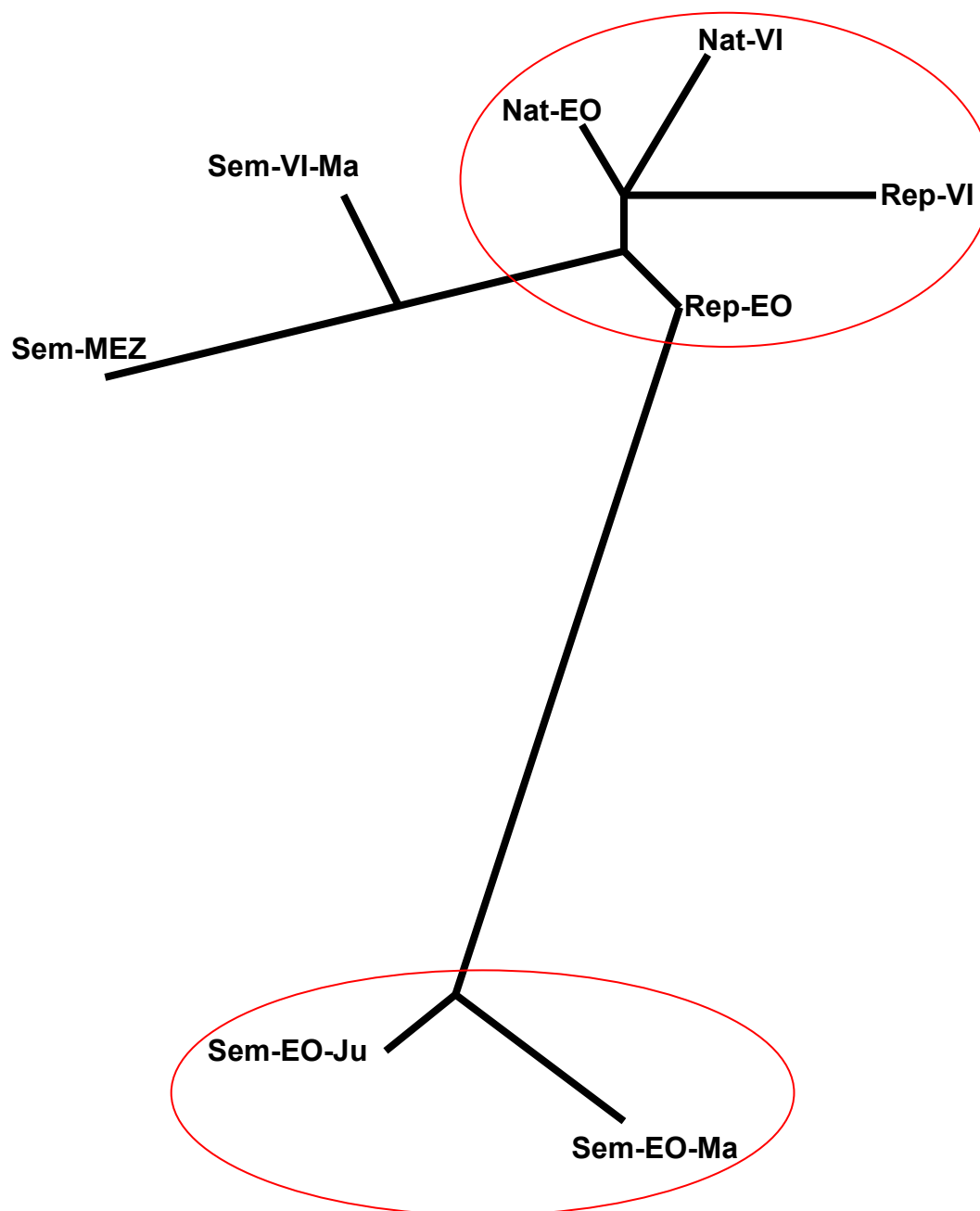


Figura 81.- Árbol neiborgh-joining con la distancia genética de Nei (1978) mostrando las relaciones existentes entre las muestras obtenidas de Asturias.

En el caso de las muestras analizadas de la localidad gallega de Cambados (Tabla XLVIII), no se observa diferenciación genética significativa en lo que respecta al banco natural, el lote de reproductores 1 y la semilla obtenida de este lote. Sin embargo, existen diferencias significativas entre la semilla producida por el lote de reproductores 2 y el banco natural. Los dos lotes de reproductores proceden del mismo banco y no muestran diferencias entre sí, pero la semilla que produjeron resulta significativamente diferente. Por otra parte, las relaciones

inferidas en el árbol de la figura 82 concuerdan con los datos de FST, destacando la semilla 2 por estar más alejada del banco natural que las demás muestras.

Tabla XLVIII.- Valores de FST de diferenciación genética entre banco natural (Cam), progenitores (Cap) y semilla (Sem) de la localidad gallega de Cambados.

	Cap 1	Sem 1	Cap 2	Sem 2
Cam	-0,00167	0,00386	0,00553	0,02108
Cap1		0,00269	0,00026	0,01586
Sem1			0,0118	0,02204
Cap 2				0,00526

En negrita, valores que muestran diferencias significativas después de la corrección secuencial de Bonferroni.

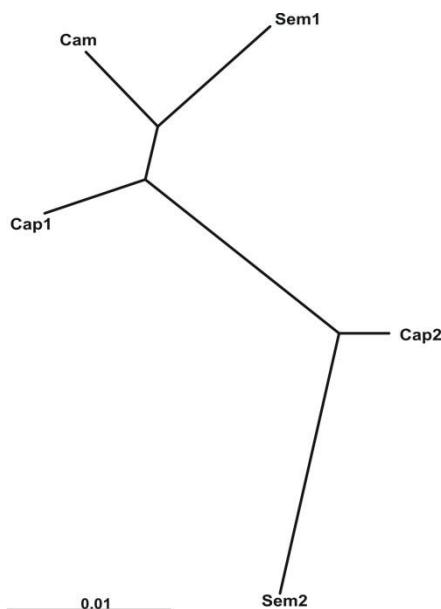


Figura 82- Árbol neighbor-joining con la distancia genética de Nei (1978) mostrando las relaciones existentes entre las muestras de Cambados.

El que en la mayoría de los casos se observe una reducción de la variabilidad genética de la semilla respecto a la existente en los bancos naturales hace suponer que, de implantarse en el medio natural la semilla obtenida, la estructura genética del banco natural sufrirá cambios anuales en función de la semilla sembrada y del porcentaje que ésta represente sobre la producción natural.

Un aspecto a destacar es que la diferenciación genética existente se debe a la dinámica de reproducción de los reproductores en criadero más que a que los reproductores no representen la variabilidad genética del medio natural.

Asignación de paternidades y contribución de los reproductores

Los efectos genéticos del proceso de producción de semilla en el criadero también se examinaron mediante análisis de paternidades.

Para tener una alta certeza y fiabilidad en la asignación de la pareja real de reproductores a un determinado descendiente son necesarios dos requisitos: (a) que se disponga del total de individuos que conforman el lote de reproductores y (b) que los marcadores utilizados en el análisis presenten altos niveles de variabilidad y PIC en ese grupo de individuos.

Como se indica en la tabla XLIX, sólo del lote de reproductores Cambados 2 se pudo disponer del total de reproductores y conocer el sexo de todos ellos, para el resto de los lotes se dispuso entre un 19 y un 70% de los reproductores que conformaban el lote. Lógicamente, esto hace que no se pueda asignar pareja de reproductores a todas las semillas analizadas, ya que se espera que un porcentaje de ellas procedan de cruzamientos entre los reproductores que no han sido analizados.

Tabla XLIX.- Lotes de reproductores y semilla analizados.

Lote de reproductores	Reproductores		Semilla	
	Nº individuos del lote	Nº individuos analizados	Nº individuos analizados	Nº individuos asignados
Cambados 1	57	40 (70 %) (24♀ y 16♂)	155	61 (39 %)
Cambados 2	49	49 (100%) (15♀ y 34♂)	149	128 (86 %)
Villaviciosa	100	19 (19%) (5♀ y 14♂)	96	24 (25%)
Eo	150	45 (30%) (sexo desconocido)	192	110 (57 %)

Atendiendo a la composición genotípica y niveles de variabilidad de 14 loci microsatélite de los lotes de reproductores (número medio de alelos por locus, entre 6,130 y 8,14, heterozigosidades medias observadas, entre 0,613 y 0,641 y PIC, entre 0,5998 y 0,6385), las simulaciones realizadas mediante el programa Cervus indican que, utilizando tanto un criterio estricto (95% de nivel de confianza) como uno más relajado (80%), las probabilidades de asignación de un descendiente a la pareja real de parentales varían entre un 99,4% y un 100% en los 4 lotes. Estos resultados indican que, si sólo interviniesen en la reproducción

los individuos analizados, los marcadores utilizados permiten asignar, con un nivel de confianza elevado, una pareja de parentales a todos o prácticamente todos los descendientes.

La proporción de descendientes a los que se le asignó una pareja de parentales osciló entre un 25 y un 86,57% (Tabla XLIX). Este porcentaje de asignación está relacionado con el porcentaje de reproductores analizados en cada lote, siendo mayor el número de descendientes asignados a una pareja de reproductores cuanto mayor es el porcentaje de reproductores disponibles en los análisis, pero también parecen estar influenciados otros factores (ej. eventos de mutación y/o errores técnicos).

La tabla L recoge la contribución a la descendencia de los parentales identificados. En todos los casos ocurre que no todos los reproductores analizados participan en la reproducción, el porcentaje oscila entre el 42 y el 85%. La proporción de sexos en los parentales se encuentra relativamente equilibrada excepto en el lote Cambados 2 donde el número de machos duplica al de hembras. En el caso del lote de reproductores Eo, como se desconocía el sexo de cada uno de ellos, se procedió a clasificarlos en dos sexos hipotéticos A y B. Para ello, una vez asignada a cada descendiente una pareja de reproductores, se tomó el primer cruzamiento analizado y se asignó de forma aleatoria, un sexo a cada uno de esos reproductores, por ejemplo $2 \times 44 \rightarrow 2A$ y $44B$. A continuación, se analizaron los demás cruzamientos en los que intervenían esos dos individuos y al otro reproductor que intervenía se le asignó el sexo contrario al del individuo ya "sexado", por ejemplo $2A \times 45 \rightarrow B45$ y $16 \times 44B \rightarrow 16A$. Mediante ese procedimiento se asignó un sexo hipotético (A o B) a todos los individuos reproductores que dejaron descendencia, comprobándose que, en ninguna de las parejas propuestas, intervenían dos individuos del mismo sexo (A x A o B x B). La única excepción se encontró con un par de individuos que intervenían en un sólo cruzamiento, por lo que no fue posible asignarles ninguno de los sexos hipotéticos establecidos.

El número medio de descendientes es similar en machos y hembras en todos los casos, excepto en Cambados 2 debido al sesgo en la proporción de sexos. Un aspecto común a todos los lotes es que, tanto las hembras como los machos y las familias, muestran una contribución desigual (reflejada en los valores de varianza del número medio de descendientes y en el rango del número de descendientes). También se observa una baja representación de las posibles familias (15-37%).

Estos resultados de ausencia de participación de todos los individuos incluidos en el lote de reproductores y contribución diferencial de los reproductores que intervienen en la reproducción son comunes a otras especies acuícolas y van asociados a un incremento de la endogamia.

Tabla L.- Participación de los reproductores en la reproducción.

Lote de reproductores	Nra	Nrp (%)	Hembras/A*				Machos/B*				Familias	
			Nhp (%)	Md	Var	Rd	Nmp (%)	Md	Var	Rd	Nf (%)	Rd
Cambados 1	40	34 (85)	19 (79)	4,47	16,70	1-15	15 (94)	5,67	41,24	1-23	42 (15)	1-5
Cambados 2	49	37 (76)	12 (80)	10,83	80,69	2-37	25 (74)	5,52	26,09	1-18	74 (25)	1-15
Villaviciosa	19	11 (58)	5 (100)	5	5	2-8	6 (43)	5	8	1-10	11 (37)	1-4
Eo	45	19 (42)	11	10	356	2-66	8	13,75	223	2-38	21 (24)	1-31

*Nra: número de reproductores analizados; Nrp: número (porcentaje) de reproductores que participan en la reproducción; *: sexo A o B; (Nhp/Nmp: número (porcentaje) de hembras/machos participantes en la reproducción; Md: número medio de descendientes; Var: varianza del número medio de descendientes; Rd: rango del número de descendientes; Nf: número (porcentaje) de familias observadas. En negrita sexo hipotético A o B.*

Estimas de tamaño efectivo e incremento de endogamia

Para obtener estimas reales del incremento de endogamia que se produce por el manejo de los reproductores en el criadero, sería necesario tener información de todos los individuos utilizados, situación que solamente se da en el caso del lote de reproductores Cambados 2. Para el resto de los lotes se puede hacer una aproximación suponiendo que los individuos analizados son una muestra aleatoria del total de reproductores utilizados, por lo que se puede asumir que si se hubiesen tenido datos del total se mantendría la misma proporción de sexos y la distribución de las participaciones individuales y de familias. Asumiendo esta situación, se estimaron los tamaños efectivos y el incremento de endogamia generado en cada lote de reproductores bajo tres supuestos: (a) que participasen todos los individuos reproductores utilizados, lo que indicaría el nivel mínimo de endogamia que se generaría; (b) considerando solamente los individuos que realmente dejan descendencia, y (c) considerando la contribución diferencial de los individuos que intervienen. Los valores obtenidos se muestran en la tabla LI. A excepción de la estimación realizada en el lote de reproductores de Villaviciosa, el incremento de endogamia que se generaría en una sola generación de reproducción en cautividad es muy superior al generalmente recomendado desde un punto de vista genético (1%) para que las poblaciones no sufran procesos de depresión endogámica.

Tabla LI.- Estimas de N_e y de ΔF en los cuatro lotes de reproductores analizados asumiendo tres supuestos.

	Cambados 1	Cambados 2	Villaviciosa	Eo
(a) Todos los reproductores	(57:34♀+23♂) $N_e = 54,88$ $\Delta F = 0,9\%$	(49:15♀+34♂) $N_e = 41,63$ $\Delta F = 1,2\%$	(100:26♀+74♂) $N_e = 79,96$ $\Delta F = 0,6\%$	(1)
(b) Reproductores con descendencia	(48:27♀+21♂) $N_e = 47,25$ $\Delta F = 1\%$	(37:12♀+25♂) $N_e = 32,43$ $\Delta F = 1,5\%$	(58:26♀+32♂) $N_e = 57,38$ $\Delta F = 0,9\%$	(63:36A+27B) $N_e = 61,71$ $\Delta F = 0,8\%$
(c) Contribución diferencial de los reproductores	$N_e = 1,53$ $\Delta F = 4,3\%$	$N_e = 6,84$ $\Delta F = 7,3\%$	$N_e = 35,2$ $\Delta F = 1,4\%$	$N_e = 8,05$ $\Delta F = 6,2\%$

(1) No se puede estimar al desconocer la proporción de cada sexo.

Los incrementos de endogamia y reducciones de tamaño efectivo que se observan se deben al número de reproductores que interviene en la reproducción, pero sobre todo a su contribución asimétrica, aspecto que tendría que tenerse muy en cuenta en la gestión de los procesos de producción en cultivo.

Las estimaciones mostradas en la tabla LI se realizaron suponiendo que los lotes de reproductores están constituidos por un número bastante elevado de

individuos (≥ 49) pero en muchas ocasiones la cantidad de reproductores disponibles es menor. Si en los lotes de Villaviciosa y Eo, por ejemplo, asumiésemos que el total de individuos analizados fuese el número total del lote de reproductores, ocurre que los incrementos de endogamia generados serían mucho mayores (Tabla LII). Esto alerta de las consecuencias de utilizar lotes de reproductores con un bajo número de individuos.

Tabla LII.- Estimaciones de N_e y de ΔF en lotes de reproductores de menor tamaño manteniendo la contribución diferencial observada en este estudio.

	Villaviciosa	Eo
(a) Todos los reproductores	19 (5♀ + 14♂) $N_e = 14,73$ $\Delta F = 3,39\%$	45 (1)
(b) Reproductores con descendencia	11 (5♀ + 6♂) $N_e = 10,91$ $\Delta F = 4,58\%$	19 (11A + 8B) $N_e = 18,53$ $\Delta F = 2,69\%$
(c) Contribución diferencial de los reproductores	$N_e = 8,94$ $\Delta F = 5,55\%$	$N_e = 5,87$ $\Delta F = 8,5\%$

(1) no se puede estimar al no conocer la proporción de individuos de cada sexo

Seguimiento del éxito de experiencias de repoblación de bancos naturales

La repoblación se llevó a cabo en el banco natural de Cambados utilizando la semilla producida por el lote de reproductores 1. Para hacer el seguimiento de la repoblación, se analizaron 14 loci microsatélite en dos muestras adicionales, una muestra de almejas con talla similar a la semilla recogida justo antes de la siembra y otra recogida en el área repoblada diez meses después de la siembra (con talla superior a la de la semilla sembrada).

El nivel de variabilidad genética de la semilla sembrada es similar a la de la muestra de almejas de talla similar a la semilla, sin embargo, en la muestra recogida después de la repoblación, se observa mayor variabilidad en cuanto al número de alelos por locus y a la riqueza alélicas (Tabla LIII). Esto podría explicarse por la mezcla del stock de semilla con el banco natural. Al mezclar stocks con distinta composición genética, cabe esperar un incremento en los parámetros señalados.

Tabla LIII.- Valores de variabilidad genética en el banco natural de Cambados antes (Cam) y después de repoblar (Rep), los reproductores (Cap), la semilla (Sem) y la muestra de talla similar a la semilla (Cas).

Parámetros	Cam	Cap	Cas	Sem	Rep
N	69	40	89	154	156
Na	7,571	7,357	8,000	7,714	9,571
Rs	6,942	7,314	6,977	6,241	8,043
Ho	0,614	0,635	0,647	0,616	0,637
He	0,651	0,667	0,669	0,636	0,741

Al comparar los valores FST, destaca la existencia de diferenciación genética significativa en la comparación de semilla y muestra de almejas de talla similar a la semilla, así como en todas las comparaciones que incluyen la muestra de repoblación. Por tanto, no puede descartarse que la repoblación haya modificado la estructura genética del banco natural. Las diferencias entre el banco repoblado y las demás muestras se reflejan igualmente en el árbol de la Fig. 63.

Tabla LIV.- Valores de FST de diferenciación genética entre las muestras.

	Cas	Cap	Sem	Rep
Cam	0,002	-0,002	0,003	0,012
Cas		-0,002	0,007	0,010
Cap			0,002	0,009
Sem				0,021

En negrita, valores que muestran diferencias significativas después de la corrección secuencial de Bonferroni.

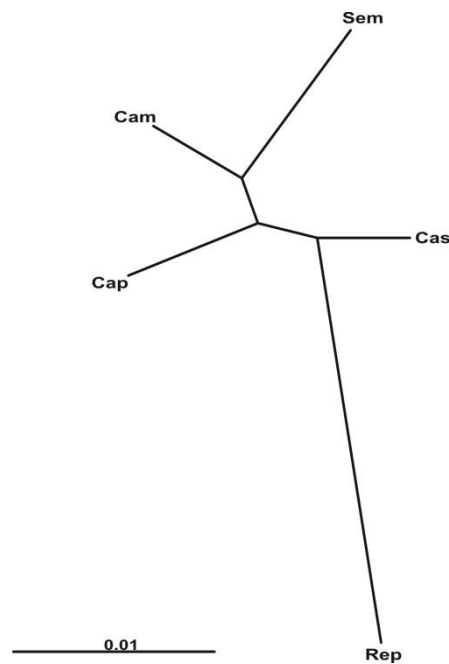


Figura 83.- Árbol neighbor-joining con la distancia genética de Nei (1978) mostrando las relaciones existentes entre las muestras de Cambados indicadas en la tabla LIV.

En conjunto los datos obtenidos aportan evidencias indirectas de que la semilla sembrada persiste en el medio natural tras la repoblación, no obstante se requieren estudios adicionales para obtener estimas cuantitativas y valorar más el éxito de la repoblación. Al mismo tiempo, los datos alertan de la necesidad de dedicar esfuerzos a producir semilla de calidad, de forma que se minimice el impacto genético de la repoblación.

2.5. CONCLUSIONES

- Para llevar a cabo el cultivo en criadero de la almeja fina, se puede partir de reproductores que ya lleguen maduros del medio natural, recogidos entre mayo y agosto, o bien traerlos al criadero en otra época y acondicionarlos hasta conseguir su madurez. No existen diferencias entre la calidad de las puestas obtenidas por uno u otro método.

Con las técnicas de acondicionamiento empleadas en este proyecto, se consiguió adelantar la época de puesta respecto al medio natural, con lo cual se amplía el período de obtención de desoves en el criadero desde 4 a 7 meses.

Para garantizar el éxito del acondicionamiento, los reproductores deben estar por lo menos en la fase de inicio de la gametogénesis. A mayor índice de condición y mayor cantidad de carbohidratos que presenten los reproductores al inicio del acondicionamiento, más corto será este período.

Los dos factores que más influyen en el acondicionamiento son en primer lugar la temperatura y luego la alimentación.

Los componentes bioquímicos que más se movilizan durante el acondicionamiento son los lípidos y los carbohidratos; los primeros aumentan su concentración y los segundos la disminuyen.

Se consiguió mejorar el éxito de la inducción a la puesta por “choques térmicos” sometiendo los reproductores a un período previo en seco y temperatura ambiente. La diferencia de temperatura aplicada en los choques térmicos debe ser al menos de 10°C. Es preferible realizar la inducción en los mismos tanques donde están estabuladas las almejas, en lugar de inducirlas en recipientes con un volumen de agua más pequeño.

- La composición bioquímica del fitoplancton no tiene variaciones en cuanto a los días de cultivo que lleve cuando se cosecha, pero si las presenta respecto a la época del año, incluso cuando el cultivo se realiza en una cámara isoterma en condiciones controladas. Estas variaciones afectan sobre todo al valor de los carbohidratos y los lípidos. Estas variaciones se dan también entre el fitoplancton producido en diferentes sistemas. Cada criadero participante en el proyecto tiene sus propios sistemas de producción de fitoplancton, por eso es importante que cada uno conozca el perfil bioquímico de sus microalgas para elaborar dietas con la mayor calidad posible.

- Los mejores resultados en los cultivos larvarios se obtuvieron cuando en la dieta suministrada está incluida la microalga *Chaetoceros muelleri* u otra alga con un perfil bioquímico similar.

En caso de necesidad, las larvas son capaces de soportar el ayuno durante los cuatro primeros días del desarrollo larvario, sin que ello suponga un agravio para el cultivo, y pudiendo recuperar su condición una vez que se inicie la alimentación.

Durante el cultivo larvario, el consumo de fitoplancton va aumentando según avanza el cultivo hasta que se acerca el proceso de la metamorfosis y la fijación de las larvas, en este momento (a las cuatro semanas de cultivo), el consumo disminuye hasta valores similares a la segunda semana de cultivo.

Las larvas D que presentan un mayor contenido en lípidos totales, alcanzan mayor supervivencia en el cultivo larvario.

- La calidad microbiológica del agua de los criaderos participantes en el proyecto es buena para realizar el cultivo de moluscos como la almeja fina. La principal fuente de entrada de bacterias a las instalaciones y los cultivos larvarios es por los propios reproductores y por el cultivo de fitoplancton, por eso es necesaria la depuración de las almejas usadas como reproductores y extremar las condiciones higiénico-sanitarias en la manipulación de los cultivos de fitoplancton. El control de la microbiota presente en un criadero es una actividad indispensable para asegurar el éxito de los cultivos.

- Se identificó un total de 25 microsátélites polimórficos, aportando por tanto marcadores genéticos necesarios para el desarrollo del proyecto y también para futuros estudios.

Se optimizaron dos PCR múltiplex que permiten examinar simultáneamente 6 y 8 loci microsátélite, reduciendo el coste económico y el tiempo de los análisis genéticos.

- Todos los bancos naturales analizados muestran niveles de variabilidad genética similares pero en la variación observada las localidades gallegas de Cambados y Redondela muestran mayoritariamente los valores más bajos en alguno de los tipos de marcadores estudiados.

Todos los análisis realizados ponen de manifiesto la existencia de diferenciación genética significativa entre las localidades estudiadas. Aunque existen excepciones, las localidades son genéticamente homogéneas por regiones pero existen diferencias entre regiones. Las localidades mediterráneas muestran la mayor diferenciación respecto a las demás. Éstas constituyen grupos genéticamente diferenciados de composición variable dependiendo del tipo de marcador empleado. No obstante, a efectos de gestionar el recurso en las costas españolas, Cantábrico, Galicia, Andalucía y especialmente el Mediterráneo deberían considerarse regiones genéticamente diferenciadas.

- La semilla producida muestra una reducción de la variabilidad genética respecto a los reproductores y al banco natural de donde proceden los reproductores. También muestra en la mayoría de los casos una diferenciación genética significativa respecto al banco natural debida a la dinámica de reproducción de los reproductores en el criadero.

- Análisis de paternidades basados en microsátélites identificados en este proyecto han permitido identificar cambios genéticos producidos durante el proceso de cultivo de criadero. Lotes de reproductores de tamaños $N = 49-150$ mostraron tamaños efectivos de tan solo 1,53-53,2, lo cual va asociado a un incremento de endogamia (1,4-7,3%) superior al recomendado (1%).

- Los cambios genéticos producidos en el criadero se deben a que no todos los reproductores participan en la reproducción y sobre todo a una contribución desigual tanto a nivel individual como por parejas. Ambos aspectos deberían ser tenidos en cuenta en el manejo de los reproductores para evitar los efectos negativos de la endogamia.

- El nivel de variabilidad y diferenciación genética del banco natural antes y después de repoblar indican que la semilla producida en el criadero persiste en el medio natural después de la siembra, no obstante, es necesario realizar estudios adicionales para evaluar más precisamente el éxito y el impacto genético de esta práctica.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

- BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N. y BONHOMME, F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- BENSADOUN, A. y WEINSTEIN, D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Analyt. Biochem.* 70:241-250.
- BENSON, G. 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27: 573-580.
- BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M. y BAURENS, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- BROOKFIELD, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating nullallele frequency from heterozygote deficiency. *Molec. Ecol.* 5: 453-455.
- CHAPUIS, M.P. y ESTOUP, A, 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-629.
- CHEVASSUS, B. 1989. Aspects génétiques de la constitution de populations d'élevage destinées au repeuplement. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 314: 146-168.
- CHRISTIE, W.W. 1982. Lipids Analysis, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, 209 pp.
- CHYBICKI, J. y BURCZYC, J, 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J. Hered.* 100: 106-113.
- CORDERO, D.; PEÑA, J.B. y SAAVEDRA, C. 2008. Polymorphisms at three introns in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the grooved carpet-shell clam (*R. decussatus*). *J. Shellfish Res.* 27:301-306.
- CORDERO, D.; PEÑA, J.B. y SAAVEDRA, C. 2012. Genetic structure of the grooved carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) as inferred from introns and mitochondrial DNA variation (en curso de publicación).
- DELGADO, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2002. Hermaphroditism in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) from the Galicia coast (Spain). *Scientia Marina*, 66 (2): 183-185.
- DEVAUCHELLE, N. 1990. Sexual development and maturity of *Tapes philippinarum*. In: (E.S.A.V., Ed. Verone), *Tapes philippinarum, Biología e Sperimentazione*, 3: 47-62.
- DREYWOOD, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem.* (Anal. Ed.) 18: 499.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S. y GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- EVRARD, V. 2007. Assessing the fate of organic matter in subtidal sandy sediments using carbon and nitrogen stable isotopes as deliberate tracers. Thesis Doctoral. Univ Utrecht.

- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. y SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online* 1:47-50.
- FERNÁNDEZ-TAJES, J. y MÉNDEZ, J. 2007. Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J. Agr. Food Chem.* 55: 7278-7282.
- FELSENSTEIN, J. 1989. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- FOLCH, J.; LEES, M. y STANLEY, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animals tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- FRAGA, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. *Investigación Pesquera III*:69-74.
- GALLOIS, D. 1977. Sur la reproduction des palourdes, *Venerupis decussata* (Linné) et des clovisses, *Venerupis aurea* (Gmelin) de l'étang de Thau (Hérault). *Vie Milieu*, XXVII, 2A: 233-254.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485-486.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- HESS, H.H.; LEES, M.B. y DERR, J. E. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analyt. Biochem.* 85: 295-300.
- HOLLAND, D.A. y CHEW, K.K. 1974. Reproductive cycle of the Manila clam (*Venerupis japonica*), from Hood Canal, Washington. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 64: 53-58.
- HOLLELEY, C.E. y GEERTS, P.G. 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* 46: 511-517.
- HUBISZ, M.J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M. y PRITCHARD, J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Res.* 9: 1322-1332.
- JAKOBSSON, M. y ROSENBERG, N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation. Program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.
- JENSEN, J.L.; BOHONAK, A.J. y KELLEY, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genet.* 6:13
- KALINOWSKI, S.T. y TAPER, M.L. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conserv. Genetics.* 7: 991-995.
- 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* 193:265-275.

- MANZI, J.J. y CASTAGNA, M.A. (Eds). 1989. Clam mariculture in North America. New York. Elsevier, *Science Pub.*, Amsterdam, 461 pp.
- MARSHALL, R.; MCKINLEY, S. y PEARCE, C.M. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture* 2: 33-55.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.E.B. y PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- MEGLÉCZ, E.; ANDERSON, S.J.; BOURGUET, D.; BUTCHER, R.; CALDAS, A.; CASSEL-LUNDHAGEN, A.; D'ACIER, A.C.; DAWSON, D.A.; FAURE, N.; FAUVELOT, C.; FRANCK, P.; HARPER, G.; KEYGHOBADI, N.; KLUETSCH, C.; MUTHULAKSHMI, M.; NAGARAJU, J.; PATT, A.; PETENIAN, F.; SILVAIN, J.F. y WILCOCK, H.R. 2007. Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Mol. Biol.* 16: 175-185.
- METCALFE, L.D. y SCHMIT, A.A. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33: 363.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NICOLAS, J.L.; CORRE, S. y COCHARD, J.C. 2004. Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microbial Ecology*, 48: 400-413.
- NÓVOA, S.; OJEA, J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D. y RODRÍGUEZ, J.L. 2007. Calidad ovocitaria de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), relacionada con su contenido en ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. 419-422.
- OJEA, J.; PAZOS, A.J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; SÁNCHEZ, J.L. y ABAD, M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238:451-468.
- OLSEN, R.E. y HENDERSON, R.J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129: 189-197.
- PRADO, S. 2006. Microbiota asociada a criaderos de moluscos. Patogénesis y probiosis. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- PERNET, F.; BRICELJ, V.M. y PARRISH, C.C. 2005. Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327: 115-133.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M. y DONNELL, Y.P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- RAYMOND, M. y ROUSSET, F. 1995a. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- RAYMOND, M. y ROUSSET, F. 1995b. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.

RICE, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.

RIQUELME, C.E.; CHAVEZ, P.; MORALES y HAYASHIDA, G. 1994. Evidence of parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biol. Res.* 27: 129-134.

ROSENBERG, N.A. 2004. Destruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes* 4: 137-138.

ROUSSET, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145 : 1219-1228.

ROUSSET, F. 2008. GENEPOP' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molec. Ecol. Resour.* 8: 103-106.

SÁINZ-HERNÁNDEZ, J.C.; MAEDA-MARTÍNEZ, A.N. 2005. Sources of Vibrio bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study. *Aquaculture Research*. 36: 1611-1618.

SAITOU, N. y NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.

SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1991. Biometry, (2^o ed). W.H. Freeman.

SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1999. Biometry (3^o ed.). WH Freeman.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. y KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.

UTTING, S.D. y MILLICAN, P.F. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165:167-178.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M. y SHIPLEY, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molec. Ecol. Notes*. 4: 535-538.

WEIR, B.S. y COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

WILSON, J.H. y SEED, R. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations B* 15:1-30.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations Vol. 4, *Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL.

YASUDA, N.; NAGAI, S.; YAMAGUCHI, S.; LIAN, C.L. y HAMAGUCHI, M. 2007. Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Mol. Ecol. Notes* 7: 43-45.

3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO

Anexos en archivos adjuntos con su correspondiente nombre:

- Archivo 1: Informe Andalucía
- Archivo 2: Informe Asturias
- Archivo 3: Informe Cantabria
- Archivo 4: Informe Cataluña
- Archivo 5: Informe Galicia