



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EVALUACIÓN DE LOS FACTORES CRÍTICOS
EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE OSTIÓN
Crassostrea gigas, QUE INFLUYEN EN SU
DESEMPEÑO BIOLÓGICO**

TESIS

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

FELIPE DE JESÚS REYNAGA FRANCO

Hermosillo, Sonora, México

03 de julio de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctor en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Felipe de Jesús Reynaga Franco

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

EVALUACIÓN DE LOS FACTORES CRÍTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA
DE OSTIÓN *Crassostrea gigas*, QUE INFLUYEN EN SU DESEMPEÑO BIOLÓGICO

T E S I S

que para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

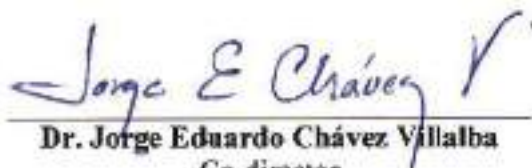
FELIPE DE JESÚS REYNAGA FRANCO

APROBACIÓN

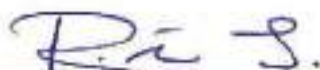
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada "Evaluación de los factores críticos en la producción de semilla de ostión *Crassostrea gigas*, que influyen en su desempeño biológico", presentada por **Felipe de Jesús Reynaga Franco**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Co-director




Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba
Co-director



Dra. Reina Castro Longoria
Sinodal Secretario



Dr. Ramón Héctor Barraza Guardado
Sinodal



Dr. José Alfredo Arreola Lizárraga
Sinodal

DEDICATORIA

A *Dios*, por todo

A mi compañera de vida, mi amor, mi esposa: *Lydia Yugliza*

A mi primera motivación, mis Padres: *Felipe y Mony*

A mi principal ejemplo, mis Hermanos: *Melissa, Israel y Azael*

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Biociencias de la Universidad de Sonora, por brindarme la oportunidad de desarrollar mis estudios de Doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., por las facilidades otorgadas durante mis estudios de Doctorado.

A mis Co-Directores de tesis, ***Dr. José Manuel Grijalva Chon*** y ***Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba***, por sus valiosas contribuciones, por su confianza, paciencia y conocimientos.

A mis Sinodales, la ***Dra. Reina Castro Longoria***, ***Dr. Ramón Héctor Barraza Guardado*** y ***Dr. José Alfredo Arreola Lizárraga***, por su valiosa contribución en el desarrollo de esta tesis y de mi formación general.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Molecular, Histología y el posgrado en Biociencias, al ***cDr. Martín Acedo Valdez***, al personal técnico del CIBNOR, Unidad Guaymas y al señor ***Víctor Vera López*** del CREMES.

RESUMEN

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es el bivalvo más cultivado en el mundo y los ingresos económicos son de los más altos en la acuicultura. Las semillas son el principal insumo para desarrollar los cultivos comerciales; éstas pueden ser obtenidas del medio natural o producidas en criaderos o laboratorios comerciales. Las semillas de laboratorio han presentado problemas como altas mortalidades, lento desarrollo y enanismo durante su cultivo. Sin embargo, no se ha determinado el origen de estos problemas debido a que no se han establecido los criterios de la calidad en las semillas, ni existen protocolos para evaluarla. Esta tesis comprende tres aspectos principales; 1) el análisis y evaluación del proceso de producción de semilla en laboratorios del noroeste de México, 2) la determinación del desempeño biológico de las semillas en cultivos experimentales en la Laguna La Cruz, Sonora, y 3) el uso de la inferencia multi-modelo y la teoría de la información para determinar los patrones de crecimiento individual de *C. gigas*. Para el primer caso, se diseñó un protocolo integral para evaluar la producción de semilla en laboratorio determinando el nivel de control en los procesos de producción con referencia en valores encontrados en la bibliografía. Esto se realizó en cuatro criaderos comerciales del noroeste del país (A, B, C, y D). El protocolo sirvió para identificar debilidades y puntos críticos en la producción de semilla, con un resultado global de semilla con calidad regular. El protocolo debe ser validado en otros sistemas de producción, con la finalidad de garantizar su uso generalizado. Con respecto al desempeño biológico, las semillas presentaron en general buenos resultados de crecimiento, rendimiento y supervivencia en el cultivo experimental, pero se detectaron diferencias en los patrones de crecimiento entre los diferentes laboratorios. El crecimiento de la concha estuvo regulado por la temperatura mientras que la concentración de seston y clorofila *a* indicaron disponibilidad de alimento durante todo el cultivo, lo cual se reflejó en una ganancia sostenida en el peso y un índice de condición adecuado (>50). Finalmente, la inferencia multi-modelo fue de ayuda para identificar las diferencias entre los patrones de crecimiento de los distintos laboratorios. Los resultados indicaron que, aunque el crecimiento parece similar, el ajuste de los datos de cada laboratorio correspondió a diferentes modelos de crecimiento. Esto sugiere que hay diferencias entre los linajes, lo que influye en los patrones de crecimiento. Los resultados de este trabajo pueden contribuir a que el cultivo de *C. gigas* mejore en la región para beneficio de productores de semilla, ostricultores y la acuicultura en general.

ABSTRACT

The Japanese oyster *Crassostrea gigas* is the most cultivated bivalve in the world and the economic income is among the highest in aquaculture. The spat is the main input to develop commercial cultivations; it can be obtained from the natural environment, produced in hatcheries or commercial laboratories. Spat from hatcheries has presented problems such as high mortalities, slow development, and dwarfism during their cultivation. However, the origin of these problems has not been determined because the quality criteria have not been established for the spat, and there are no protocols to evaluate it. This thesis comprises three main aspects; 1) the analysis and evaluation of the spat production process in hatcheries in northwestern Mexico, 2) the determination of the biological performance of spats in experimental cultivations in Laguna La Cruz, Sonora, and 3) the use of multi-model inference and information theory to determine the individual growth patterns of *C. gigas*. For the first case, an integral protocol was designed to evaluate the spat production in hatcheries throughout determining the level of control in the production processes with reference to values found in the bibliography. This was done in four commercial hatcheries in the northwestern of the country (A, B, C, and D). The protocol served to identify weaknesses and critical points in spat production, with a global result of spat with regular quality. The protocol should be validated in other production systems, in order to ensure its widespread use. Regarding the biological performance, the spat presented in general good results of growth, yield and survival in the experimental culture, but differences were detected in the growth patterns between the different hatcheries. The growth of the shell was regulated by temperature while the concentration of seston and chlorophyll *a* indicated food availability throughout the cultivation, which was reflected in a sustained gain in weight and an adequate condition index (> 50). Finally, the multi-model inference was useful to identify the differences between the growth patterns of the different hatcheries. The results indicated that although the growth seems similar, the fitness of the data for each hatchery corresponded to different growth models. This suggests that there are differences between the lineages, which influences the growth patterns. The results of this work can contribute to improve the culture of *C. gigas* in the region for the benefit of spat producers, oyster farmers, and aquaculture in general.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN.....	<i>i</i>
DEDICATORIA.....	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>viii</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	5
I.1. Producción de <i>Crassostrea gigas</i>	5
I.2. Producción de semilla	8
I.3. Variabilidad genética	12
I.3.1 Alocimas	13
I.3.2. ADN mitocondrial	15
I.3.3. Microsatélites	16
I.4. Patógenos de moluscos bivalvos	18
I.5. Variabilidad ambiental y desempeño biológico	20
I.6. Teoría de la información: Enfoque de multimodelos	21
I.7. Índice de condición	23
II. OBJETIVOS	27
II.1. Objetivo general	27
II.2. Objetivos particulares	27
III. RESULTADOS	28
III.1. Designing a protocol to evaluate <i>Crassostrea gigas</i> spat production in hatcheries: identifying critical points.	29
III.2. ¿Son 45 años de aislamiento reproductivo suficientes para impedir la amplificación de genes mitocondriales en el ostión del Pacífico?	65
III.3. Biological performance of <i>Crassostrea gigas</i> stocks produced at different hatcheries and cultivated same environmental conditions.....	77
III.4. Influencia de la variabilidad ambiental de la Laguna la Cruz (Sonora en el crecimiento y condición del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	90
III.5. Multi-model inference as criterion to determine differences in growth patterns of distinct <i>Crassostrea gigas</i> stocks.....	99

	Página
IV. DISCUSIÓN.....	115
IV.1. Producción de semilla en laboratorio.....	115
IV.2. Variabilidad genética.....	117
IV.3. Patógenos.....	118
IV.4. Variabilidad ambiental y desempeño biológico.....	119
IV.5. Modelación del crecimiento por la Inferencia Multi Modelo.....	120
IV.6. Protocolo para evaluar la calidad de la semilla de ostión producida en laboratorio.....	121
V. CONCLUSIONES.....	122
VI. RECOMENDACIONES.....	123
VII. LITERATURA CITADA.....	124
VIII. APENDICE.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Criteros para la medición de la concha de ostión según Gastollf (1964).	2
2	Principales países productores de <i>Crassostrea gigas</i> según FAO (2006).	5

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Producción (toneladas) de <i>Crassostrea gigas</i> por estado en México (SAGARPA, 2014).	8
2	Relación de artículos científicos en función de los objetivos particulares de esta tesis.	27

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el conjunto de técnicas y tecnologías enfocadas a la producción controlada de organismos vegetales y animales, que transcurren al menos una parte de su ciclo vital en relación con el agua. Esta actividad es utilizada para obtener ingresos económicos o recuperar poblaciones disminuidas por causa de la pesca furtiva o cambios ambientales (Duarte *et al.*, 2007). En la actualidad la acuicultura tiene gran relevancia no solo como actividad económica, sino que juega un papel importante en la alimentación mundial. La totalidad de la producción acuícola de diversas especies de consumo humano para el 2016, superó los 165 millones de toneladas y la tendencia de consumo de los productos obtenidos por la acuicultura va en aumento (FAO, 2018).

El cultivo de moluscos es una de las principales actividades de la acuicultura mundial, particularmente los moluscos bivalvos del género *Crassostrea* son de los organismos más cultivados. Algunas especies del género de interés comercial en la acuicultura son: *Crassostrea rhizophorae* (Dos Santos *et al.*, 1985), *Crassostrea gigas* (Deslous-Paoli *et al.*, 1988), *Crassostrea angulata* (Boudry *et al.*, 1998), *Crassostrea virginica* (Serrano, 1998) y *Crassostrea corteziensis* (Chávez-Villalba *et al.*, 2005); destacando la especie *C. gigas* (ostión japonés) principalmente por la adaptabilidad y la facilidad del manejo de cultivo. Esta especie se introdujo en países como Estados Unidos de América en 1965, Francia en 1971 y Australia en 1969, entre otros, (Miossec *et al.*, 2009). Hoy en día China y Japón son los principales productores a nivel mundial (FAO, 2018).

En México, el ostión japonés es de gran importancia. Su cultivo se concentra en el noroeste del país en donde cada año el número de ostricultores que cultivan la especie ha ido en aumento, desde la introducción de la especie en 1973 en la zona de San Quintín, Baja California (Chávez-Villalba, 2014). En 2019 se encuentran registradas en el padrón del Comité de Sanidad Acuícola de Baja California (CESAIBC) y Baja California Sur (CESABCS), 44 unidades de producción de ostión japonés; el Comité de Sanidad Acuícola de Sonora (COSAES) reporta 33 y el Comité de Sanidad Acuícola de Sinaloa (CESASIN) cuenta con un padrón de 22 unidades de producción.

El principal insumo para realizar el cultivo comercial de *C. gigas* es lo que se denomina semilla. Éstas son los juveniles de ostión que tienen una talla entre 0.5 y 10 milímetros de altura de la concha (Figura 1).

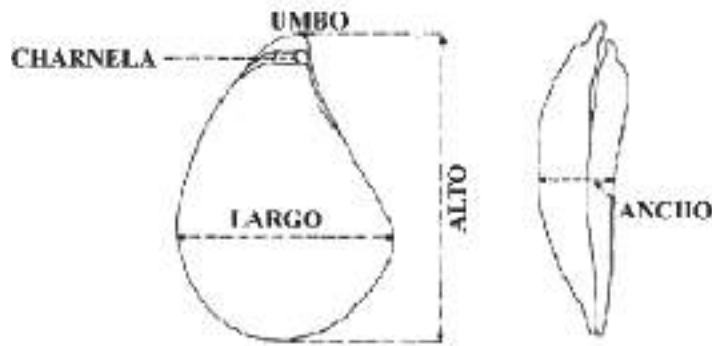


Figura 1. Criteros para la medición de la concha de ostión según Gastollf (1964).

La semilla puede provenir del medio silvestre o feral, donde la especie vive naturalmente o fue introducida, también de laboratorios o criaderos certificados en países donde no se encuentran semillas en el medio, o la cantidad y calidad de las mismas no es la óptima para desarrollar la ostricultura a niveles comerciales. La colecta natural se desarrolla empleando colectores que se colocan en puntos estratégicos en esteros o lagunas costeras durante la etapa de desoves, con el fin de atraer a las larvas que en ese momento tienen una forma de vida pelágica (Robert y Gerard, 1999).

Los colectores se elaboran con concha de ostión o de otros bivalvos, ya que éstas son atractivas para que las larvas se fijen y lleven a cabo su metamorfosis transformándose en pequeños juveniles que quedan adheridos al sustrato. Los colectores con semilla son trasladados posteriormente a criaderos donde serán engordadas hasta alcanzar la talla comercial de > 80 mm de altura de la concha (FAO, 2005). En los países donde la cantidad y calidad de las semillas silvestres no son las adecuadas, se han establecido laboratorios productores de semillas, que pueden producir durante y fuera de la época de reproducción natural de la especie gracias a que las condiciones pueden ser controladas a voluntad (Helm, 2004).

En México, el total de la semilla de ostión japonés cultivada proviene de laboratorios productores certificados (Chávez-Villalba, 2014). Según reportes de los ostricultores de la

región, uno de los problemas más críticos y recurrentes es la baja calidad de la semilla, sea ésta producida nacionalmente o importada de otros países (Hoyoz-Chairez, 2004). De acuerdo con los productores, en muchos casos la semilla presenta mala calidad y poca homogeneidad, lo que se manifiesta en mortalidades elevadas, enanismo y lento crecimiento. A la fecha no existen estudios que hayan abordado esta problemática en nuestro país. En la producción de las semillas y en el cultivo de la especie, existen factores técnicos, biológicos y ambientales, pero se puede presumir que la mala calidad y variabilidad en los lotes de semilla producidos pudieran derivar de los protocolos de producción. Los reportes sobre la calidad de la semilla producida en laboratorios en México y Latinoamérica son escasos (Uriarte *et al.*, 2008), mientras que en Francia se han reportado problemáticas de escases de semilla por cambios ambientales (His y Robert, 1987). Actualmente se desconoce si existen problemas con el desempeño biológico de las semillas en campo, a pesar del desarrollo de herramientas tecnológicas y la expansión de la ostricultura.

Para determinar la calidad de las semillas producidas en laboratorio deben analizarse cada componente de los protocolos modificados por los diferentes laboratorios, según su infraestructura. Sin embargo, muchos de los detalles técnicos de esos procesos no se encuentran documentados en la literatura científica y en la mayoría de los casos los laboratorios no los revelan porque los manejan como secretos de producción.

Otros factores asociados a la producción son la variabilidad genética y la susceptibilidad a patógenos. En el primer caso, es importante conocer el origen de los reproductores, las cruzas realizadas entre diferentes lotes, la cantidad de reproductores y el origen de los mismos, así como establecer controles en sus desoves. Si consideramos que dentro de la acuicultura existen procesos de selección artificial que propician la endogamia, un mayor número de reproductores podría contribuir a una mayor variabilidad. Sin embargo, a la fecha no se ha comprobado si un número mayor de los mismos ofrezca una mejor variabilidad en las semillas producidas (Langdon *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2007).

En el caso de patógenos, recientemente los laboratorios enfrentan problemas con diferentes enfermedades destacando las mortalidades de verano. Durante la etapa de producción de semilla pueden presentarse contingencias sanitarias ya que se han reportado mortalidades masivas en laboratorios relacionados a diversos patógenos. Se sabe que el Herpes virus de los

ostreidos tipo 1 (OsHV-1) provoca altas mortalidades en etapas tempranas de *C. gigas* (Schikorski *et al.*, 2011; De La Re-Vega *et al.*, 2018), por lo que la inocuidad de las semillas producida en laboratorios es un criterio importante para evaluar su calidad.

Por otro lado, se encuentran los factores asociados al desempeño biológico de las semillas durante su cultivo. En teoría, un lote de semillas de buena calidad se desarrollaría mejor bajo condiciones de cultivo y tendría más tolerancia a las variables ambientales que otro de baja calidad. Para ello es importante determinar las tasas de crecimiento, la condición fisiológica a lo largo del cultivo, la tasa de sobrevivencia y todo esto relacionarlo con la variación ambiental en las zonas de cultivo.

En el presente trabajo se llevaron a cabo diferentes estudios y experimentos para identificar y evaluar los elementos relacionados a la calidad de la semilla como son: (1) el análisis de las etapas de los protocolos de producción, (2) la variabilidad genética, (3) el desempeño biológico y (4) la susceptibilidad a patógenos, con el objetivo de desarrollar un protocolo de evaluación de la calidad de semilla de *C. gigas* aplicable a cualquier laboratorio en el mundo. Con esto se pretende generar conocimiento que contribuya a identificar los puntos críticos de los procesos de producción y del desempeño de la semilla en campo y con esto coadyuvar a mejorar la industria ostrícola.

I. ANTECEDENTES

I.1. Producción de *Crassostrea gigas*

El cultivo de moluscos es una de las principales actividades acuícolas a nivel mundial solo rebasado por el cultivo de microalgas, peces y crustáceos. Según la FAO (2018), la producción de *Crassostrea gigas* es una de las más importantes en la acuicultura mundial y la más alta de todos los moluscos cultivados. A partir de 2003 su cultivo se había expandido más que cualquier otra especie de cultivo (Figura 2).



Figura 2. Principales países productores de *Crassostrea gigas*. Tomado de FAO (2018).

Los cinco principales países productores de *C. gigas* en el mundo son: (1) China con 360,000 t/año, (2) Japón con 261,000 t/año, (3) la República de Corea con 238,000 t/año, (4) Francia con 115,000 t/año y (5) Estados Unidos de América con 43,000 t/año (FAO, 2018). Estos países se caracterizan por tener la capacidad de obtener semillas del medio silvestre. Sin embargo, el establecimiento de laboratorios productores de semilla ha tenido gran aceptación sobre todo en China, el principal productor en el mundo, donde la totalidad de las semillas de

C. gigas cultivadas provienen de laboratorios productores certificados (Li *et al.*, 2006). Esto refleja la relevancia de los laboratorios de producción de semillas en la rentabilidad de la ostricultura.

Japón cuenta con una importante tradición ostrícola, donde *C. gigas* (especie nativa) es la más cultivada. En ese país existen registros de granjas ostrícolas que datan desde principios del siglo XIX. Actualmente, la producción japonesa se sostiene a partir de la captura de larvas silvestres. Sin embargo, a partir de 1991 se han establecido laboratorios productores, que se caracterizan principalmente por ofrecer semillas triploides, las cuales tienen gran aceptación entre los productores locales (Akashige y Kususki, 1996). Una situación similar es la que se observa en la República de Corea (Corea del Sur), donde a pesar de depender mayoritariamente de la captación silvestre, los laboratorios productores empiezan a tener aceptación en la industria ostrícola, principalmente por que se han presentado problemas de escasez de semillas silvestre por problemas ambientales (Hwang *et al.*, 2003).

En contraste, en Francia, el cuarto productor mundial de *C. gigas*, la mayor cantidad de semilla cultivada proviene del medio silvestre a partir de poblaciones ferales. Utilizando colectores en lagunas costeras y estuarios se capturan aproximadamente 17 billones de larvas durante el primer mes después de los desoves (Robert y Gerard, 1999). Se estima que aproximadamente el 10% de la semilla cultivada en este país es producida en laboratorios productores certificados (Muller-Feuga, 2000). Esto ha conducido a que en la actualidad estos sistemas de producción tengan una mayor aceptación por parte de los ostricultores locales, particularmente por la producción de organismos triploides y por la homogeneidad en las tallas de las semillas producidas. En este sentido, se calcula que la capacidad de producción de cada laboratorio establecido en Francia es de 2.8 millones de semillas por año, lo cual a futuro podría sostener la demanda comercial de semillas en ese país (Robert y Gérard, 1999). Un evento que marcó un precedente en el establecimiento de los primeros seis laboratorios productores en Francia, fue el que se presentó en la bahía de Arcachon, donde por dos años consecutivos no ocurrieron desoves y no hubo semilla silvestre debido a la contaminación de la bahía ya que es una importante zona turística (His y Robert, 1987).

En cuanto al cultivo de *C. gigas* en el continente americano, Estados Unidos es el principal país productor con 43,000 t/año (FAO, 2018). El ostión japonés es la especie más

cultivada, incluso por encima de especies nativas como *C. virginica*. La mayoría de las semillas cultivadas en este país provienen de laboratorios certificados (Hedgecock y Sly, 1990), Sin embargo, una pequeña proporción proviene de poblaciones ferales establecidas en las costas del Pacífico, ya que, aunque la especie fue introducida a este país entre 1971 y 1975 con el tiempo se han establecido poblaciones “naturales” que contribuyen con semilla y su pesquería aporta 500 toneladas por año a la producción (FAO, 2018).

El caso de los laboratorios de producción en Francia y en China es un claro ejemplo de la funcionalidad de los laboratorios, ya que, a pesar de tener la disponibilidad de capturar larvas silvestres, las tendencias en el mercado, las condiciones ambientales y sanitarias han favorecido la aceptación de las semillas producidas en estos sistemas de producción. Las tecnologías aplicadas en ellos les permite contar con una producción constante y ofrece una alternativa frente a la escases de semillas silvestres.

En Latinoamérica el cultivo de moluscos se ha intensificado en la última década. La introducción de *C. gigas* a Venezuela y la alta producción en Brasil de *C. rhizophorae*, han contribuido al incremento de la producción de moluscos en relación a otras especies cultivadas (Lodeiros *et al.*, 1999). En México, el cultivo de *C. gigas* inició en 1973 con la introducción de la especie en el estado de Baja California, en donde las primeras experiencias de cultivo se realizaron a partir de semilla fija en concha madre importada de Estados Unidos (Islas-Olivares, 1975). Después se importó semilla individual (suelta), la cual era necesaria para desarrollar cultivos en suspensión y fondo. Posteriormente, algunos ostricultores realizaron experimentos de fijación de semilla en postas rústicas a partir de larva pediveliger (Tapia-Vázquez *et al.*, 2008). Sin embargo, la obtención de semilla de *C. gigas* representa la mayor limitante para la sustentabilidad del cultivo de la especie, debido a que no se encuentran larvas en el medio natural para llevarlas a preengorda. Por esta razón, la totalidad de la semilla cultivada proviene de laboratorios productores certificados. Sin embargo, según reportes de los propios ostricultores locales, la calidad de la semilla es baja y existe amplia variabilidad entre los lotes producidos, incluso por el mismo laboratorio (Uriarte *et al.*, 2008).

En México, *C. gigas* es el principal molusco cultivado y sus valores comerciales están por encima de cualquier otro bivalvo cultivado en el país. Su producción se concentra en los estados del noroeste (Tabla 1), donde Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa son

los líderes de la producción acuícola nacional para esta especie. Particularmente en el año 2010, se obtuvo la mayor producción superando las 2,800 toneladas, donde Baja California destacó con una producción de 1,600 toneladas (CONAPESCA, 2012; SAGARPA, 2014).

I.2. Producción de semilla

La semilla silvestre es de gran importancia para el cultivo del ostión japonés en cuatro de los cinco países que lideran la producción mundial (China, Japón, Corea y Francia). En estos países se han establecido con éxito laboratorios productores de semilla, cada vez con mayor aceptación entre los ostricultores. Por otra parte, en Estados Unidos y México donde no se encuentran semillas silvestres o su colecta es limitada, la única fuente disponible para los ostricultores locales es la que se produce en laboratorio (Chávez-Villalba, 2014). Las principales ventajas que ofrecen los laboratorios son: (1) disponibilidad durante y fuera de la época de reproducción de la especie, (2) semilla individual o suelta (no adherida a un sustrato como el caso de semilla colectada del medio), (3) organismos más homogéneos en cuanto a talla y forma, (4) producción de organismos diploides y/o triploides, y (5) semilla certificada (libre de enfermedades o patógenos).

La producción de semilla en los principales países productores está sujeta a las características geográficas de su localidad particular, así como a la capacidad técnica y tecnológica de cada laboratorio. Los protocolos básicos para producir semilla de *C. gigas* incluyen cinco áreas esenciales: (1) manejo de reproductores (obtención, maduración y desove), (2) cultivo larvario, (3) fijación de larvas (metamorfosis para convertirse en semilla), (4) pre-engorda de semilla (para que alcance la talla de venta de ≈ 3 mm), y (5) cultivo de microalgas (Helm, 2004). Cada etapa del protocolo de producción de semilla presenta problemáticas específicas, por ejemplo, en lo que respecta al manejo y selección de los reproductores, a menudo estos se seleccionan en base a atributos físicos como son la talla el peso y el aspecto de la concha y se pasando por alto aspectos genéticos.

Tabla 1. Producción (toneladas) de *Crassostrea gigas* por estado en México (datos tomados de SAGARPA, 2014).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Baja California	1.6	150	0	137	1594	1031	1324	1058	2077
Baja California Sur	322	104	10	105	588	356	576	242	6370
Sonora	82	95	0	34	647	106	116	148	805
Sinaloa	0	0	0	7	29	21	108	84	820
Jalisco	4	0	0	1	0.5	4	1	0	9.5
Guerrero	0	0	0	0	0	0	2.2	0	0
Nayarit	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0
Total	409.6	349	10	284.2	2858.5	1518	2127.2	1532	10082

De igual manera no se ha establecido con claridad la cantidad idónea de reproductores que deben inducirse al desove para producir larvas de buena calidad. En relación a su acondicionamiento (exposición a parámetros del agua y alimentación controlada) se ha demostrado que realizar este proceso influye directamente en la cantidad y calidad de los gametos que generan y por lo tanto en la de las larvas (Lannan *et al.*, 1980; Muranaka y Lannan, 1984; Powell *et al.*, 2002; Fabioux *et al.*, 2005). Sin embargo, el criterio para evaluar el éxito del acondicionamiento no es del todo claro. Los reproductores juegan el papel más importante en la producción de semillas, a pesar de esto, el conocimiento acerca de su selección y manejo es escaso.

El cultivo larvario comprende la etapa pelágica de la larva. Esta etapa es crítica ya que es donde se presentan las mayores mortalidades dentro del protocolo de producción (Le Roux *et al.*, 2002). Generalmente las mortalidades están atribuidas a patógenos, sin embargo, la baja condición fisiológica de las semillas, endogamia y la calidad del agua pueden influir en las tasas de sobrevivencia larval (Dégremont *et al.*, 2007; Dégremont, 2011). La etapa de fijación es muy importante ya que es en esta etapa donde las larvas inician el proceso de asentamiento. El porcentaje de fijación generalmente es bajo e influyen factores como la calidad del agua, disponibilidad de alimento y un sustrato adecuado para fijarse. En este sentido, se han utilizado inductores naturales y artificiales para lograr el mayor porcentaje de asentamiento y la aplicación de probióticos es cada vez más común ya que en algunos casos han contribuido a un mayor asentamiento (Coon *et al.*, 1986; Douillet y Langdon, 1994).

La siguiente etapa en el proceso es la preengorda en la cual a las larvas fijadas (semillas) se les suministra alimentación constante para mejorar su condición fisiológica y asegurar un buen desempeño en los cultivos. La etapa de la preengorda de las semillas es la etapa menos analizada, ya que los laboratorios utilizan las tallas como el único indicador para este proceso, un sistema de tamices determina cuando una semilla puede ser comercializada, por lo que las semillas con un crecimiento más acelerado, pudieran no presentar la mejor condición fisiológica y no sobrevivir en los cultivos.

Durante cualquier etapa del proceso de producción, los organismos son alimentados con microalgas, las cuales se suministran mediante dietas mixtas, dependiendo de los requerimientos de cada criadero. Por lo tanto, en la calidad de las semillas producidas influyen, las cantidades,

especies y los valores nutricionales de las microalgas cultivadas, así como, la calidad del agua de las instalaciones. Gran cantidad de estudios demuestran la importancia de contar con especies que contengan los componentes esenciales que permitan el desarrollo de los organismos (Volkman *et al.*, 1989; Robert *et al.*, 2001; Brown y Robert 2002; Ponis *et al.*, 2006; Rico-Villa *et al.*, 2006).

En el caso de México, el desarrollo de la actividad ostrícola en sus inicios dependía enteramente de la importación de semillas provenientes principalmente de Estados Unidos. Para dar solución a esta problemática, el gobierno de Sonora construyó un centro ostrícola conocido como CREMES (Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora) en 1984. Aquí se desarrolló por primera vez la tecnología de producción de semilla de ostión japonés. El protocolo para obtener semillas de *C. gigas* en este laboratorio, según lo descrito por Hoyos-Chairez (2004), es el siguiente:

- 1) Se obtienen reproductores (talla >80 mm) de los cultivos comerciales o de ostiones mantenidos exprofeso en estos sitios, de programas de mejoramiento genético o de otros laboratorios productores, priorizando características deseables para el cultivo.
- 2) Maduración de los reproductores en sistemas abiertos (alimento natural sin control de la temperatura del agua) o cerrados. En sistemas cerrados se usa temperatura controlada del agua (>23 °C) y se ofrece abundante alimento en forma de microalgas (las especies más utilizadas son *Isochrysis* sp., *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Ch. mulleri*).
- 3) Inducción a desove de los organismos maduros a través de diferentes métodos, el más común es el térmico (cambios bruscos de temperatura), aunque también hay el químico (uso de feromonas), o el mecánico (se usan los gametos de un ostión sacrificado para estimular el desove).
- 4) Obtención de larvas, que es cuando se lleva a cabo la fecundación (combinación de gametos femeninos con los masculinos). Se estima la tasa de fertilización, se lleva a cabo el desarrollo embrionario y se obtienen las larvas trocóforas (esta fase no requiere alimento para las larvas).
- 5) Cultivo larvario, el cual inicia normalmente 24 horas después de la fecundación. Las larvas van sufriendo cambios importantes (desarrollo de órganos) pasando por varias fases larvarias (larva “D”, larva umbada, larva con mancha ocular, larva pediveliger). Esta etapa

tiene una duración variable (9 a 23 días) y requiere de alimento en forma de microalgas que aumenta de concentración conforme avanza el cultivo.

- 6) Fijación, que es cuando las larvas en estadio pediveliger o con mancha ocular están listas para llevar a cabo la metamorfosis que las convertirá en organismos con todas las características de los ostiones adultos. Para la fijación se requiere normalmente un sustrato (concha molida, láminas, costales, etc.) para que las larvas se “peguen” a él de forma definitiva.
- 7) La obtención de post-larva o semilla se refiere a la etapa que se obtiene propiamente la semilla (juvenil de ostión).
- 8) La última etapa es la pre-engorda de semilla. En la mayoría de los casos la semilla se mantiene en sistemas abiertos (alimentación natural) o cerrados (uso de microalgas como alimento) para que alcance una talla que oscile entre 0.7 y 4 mm y sea trasladada al mar para iniciar los cultivos.

Además del CREMES, en la actualidad se han establecido diferentes laboratorios productores de semillas de ostión japonés en el noroeste de México (Chávez-Villalba, 2014). No obstante, cada laboratorio desarrolla su propia tecnología de producción de semilla con base en la literatura disponible, pero los puntos clave son los que se obtienen a través de los trabajos de investigación que se realizan en las propias instalaciones. Por esta razón, la mayor parte de la información acerca de los protocolos no se da a conocer ya que en muchos casos se manejan como secreto de producción.

I.3. Variabilidad genética

La variación genética es la materia prima a partir de la cual las diversas poblaciones de una especie se adaptan a los cambios en su ambiente. Nuevas variaciones genéticas surgen en el seno de las poblaciones a partir de las mutaciones espontáneas de un gen o por inmigración de individuos de poblaciones distintas genéticamente. La variabilidad genética de una población puede estimarse a partir del número de alelos, es decir, las formas alternativas de un gen (Nei, 1973), del número de genotipos, del polimorfismo y del nivel de heterocigosis. Los genetistas de poblaciones han tardado varias décadas en establecer la importancia de la variación genética

en las poblaciones naturales. Se sabe, por ejemplo, que la respuesta a la selección natural de poblaciones experimentales se acelera cuando existen radiaciones inductoras de mutaciones y/o por la introducción de genes de líneas distintas.

En términos de la preservación de los recursos genéticos, podemos esperar que el mantenimiento del máximo nivel de variación genética en una línea sea benéfico, así como el mantenimiento de líneas múltiples que puedan servir como fuentes adicionales de información genética a través de la hibridación. De allí que la pérdida de variación genética por cualquier motivo (por ejemplo, selección prolongada, endogamia, aislamiento, cuello de botella) resultará en una pérdida de potencial de adaptabilidad en una población (Barg, 1994). Por lo anterior, resulta de gran relevancia realizar estudios sobre la variabilidad genética de las especies con importancia económica, tal es el caso del ostión japonés *Crassostrea gigas*, el cual es el molusco mayormente cultivado en el mundo y en México es uno de los recursos acuícolas más valiosos, ya que después del camarón es el segundo cultivo en importancia (FAO, 2018).

Para analizar la variabilidad genética de alguna especie de interés se utilizan marcadores moleculares. En la literatura se encuentran varias definiciones del término marcador molecular, por ejemplo, Caetano-Anólles *et al.* (1991) los definen como segmentos de ADN que se consideran marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma. Ferreira y Grattapaglia (1996), amplían el concepto definiendo los marcadores moleculares como: cualquier fenotipo molecular originado de la expresión de un gen o un segmento específico de ADN, aplicados al estudio del genoma. Los marcadores moleculares se han ido modificando con el paso del tiempo, hasta crear numerosas herramientas de diferenciación genética de alta confiabilidad. Los marcadores más utilizados para estimar la variabilidad genética son las alozimas (primeros marcadores moleculares), ADN mitocondrial y microsatélites (Wright *et al.*, 1995).

I.3.1. Alozimas

Las alozimas son formas alternativas de una enzima, codificadas por diferentes alelos de un mismo locus genético. Este concepto se incluye dentro de la más amplia denominación de isoenzimas, que comprende todas aquellas formas alternativas de una misma actividad enzimática en un mismo organismo, con independencia de su origen. Las alozimas han

demostrado ser marcadores confiables, sin embargo, no son capaces de determinar diferencias específicas intrapoblacionales (Allendorf y Luikart, 2009).

La primera evaluación de la variabilidad genética en *C. gigas* fue realizada por Buroker *et al.* (1975), quienes utilizaron alozimas en poblaciones de Mud Bay, Washington, EUA. Analizaron 11 sistemas enzimáticos y obtuvieron valores de heterocigosis de 0.21. El segundo estudio de Buroker *et al.* (1979) se realizó para establecer similitudes y distancias genéticas entre tres poblaciones japonesas de *Crassostrea gigas* y *Saccostrea commercialis*. En ese trabajo se analizaron 18 sistemas enzimáticos para obtener 30 loci, reportando valores de heterocigosis observada de 0.20 a 0.22 en esas poblaciones y concluyendo en que *C. gigas* es la especie, entre los moluscos bivalvos, que presenta los mayores valores de heterocigosis, los cuales probablemente le confieren una mayor capacidad de adaptación a diversos ambientes.

Por otro lado, Banks *et al.* (1994) analizaron la incompatibilidad de los gametos de *C. sikamea* y *C. gigas*, apoyándose en técnicas de electroforesis. Se compararon los resultados de variación de 78 muestras de *C. sikamea*, con 19 loci comúnmente presentes en diferentes poblaciones de *C. gigas* en Norteamérica previamente reportados en la literatura (Buroker *et al.*, 1975). Los resultados de las alozimas arrojaron que las especies *C. gigas* y *C. sikamea* comparten solamente 5 loci de los 19 analizados en la literatura, lo cual hace referencia a una distancia genética relativamente corta pero lo suficientemente distante, para impedir la reproducción entre estas especies. Esos autores señalan que la clasificación de *C. sikamea* como una especie diferente a *C. gigas* es correcta, ya que además de las diferencias morfológicas y las diferencias fisiológicas existe suficiente evidencia genética para clasificarlas como especies distintas. McGoldrick y Hedgecock (1997) determinaron los niveles de endogamia de las poblaciones de *C. gigas* cultivadas en Washington. Después de comparar la heterocigosis observada contra la esperada según el modelo de Hardy-Weinberg, señalan que existe un nivel altamente significativo de endogamia en los tres cultivos analizados, atribuyendo estos niveles principalmente al número relativamente bajo del stock de reproductores utilizados por los laboratorios productores de semillas.

En México, los trabajos sobre variabilidad genética en *C. gigas* son escasos, los primeros estudios en esta disciplina fueron realizados por Rosa-Vélez *et al.* (1991), quienes analizaron la variabilidad genética de los cultivos de *C. gigas* en la Bahía de San Quintín en

Baja California. Compararon la variabilidad genética de siete loci de un muestreo aleatorio de los cultivos de la zona, contra loci de ostiones cultivados en Japón cuya variabilidad genética había sido reportada previamente por Buroker *et al.* (1979). Además, estimaron distancias genéticas para determinar si las poblaciones cultivadas en San Quintín, provienen de alguna de las poblaciones nativas previamente estudiadas en Japón. Los autores encontraron que existía deficiencia de heterocigotos cuando compararon los valores observados contra los esperados del modelo Hardy-Weinberg, atribuyéndolo a una presión de la selección natural en contra de los heterocigotos, así como a un posible efecto Wahlund, puesto que hay reportes de introducción masiva de semilla proveniente de los Estados Unidos. Por otra parte, los análisis de distancia genética aportaron evidencia de que el pie de cría del cual descenden las semillas cultivadas en San Quintín proviene de la población japonesa de Miyagi ya que comparten 4 de los 7 loci analizados en este estudio. En años más recientes, Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon (2010), analizaron la variabilidad genética de las semillas triploides de *C. gigas* y *C. corteziensis* producidas en el CREMES. De una muestra de 78 organismos de *C. gigas* se analizaron 16 loci encontrando en 12 de ellos polimorfismo, además no se encontraron diferencias significativas entre la heterocigosis observada y la calculada por el modelo Hardy-Weinberg, debido probablemente a que sean organismos triploides lo cual contribuye a una mayor variabilidad genética. Sin embargo, los valores de variabilidad son menores a los reportados en organismos triploides producidos en los Estados Unidos de América.

I.3.2. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial es una herramienta comúnmente utilizada para evaluar diferencias genéticas entre poblaciones de una misma especie o de linajes con divergencia reciente. El genoma mitocondrial contiene un total de 37 genes de los cuales 13 genes codifican proteínas, 22 genes codifican ARN de transferencia y 2 genes codifican ARN ribosómicos (Smith, 1992), además una región control no codificante. Los trabajos sobre variabilidad genética de *C. gigas* empleando este marcador molecular son escasos, sin embargo, existen estudios que demuestran la confiabilidad de este marcador molecular en diferentes especies tanto en mamíferos, aves y peces. Este marcador es empleado mayormente en estudios poblacionales de mamíferos, incluyendo humanos (Stoneking *et al.*, 1991; Van Oven y Kayser, 2009), esto refleja la

confiabilidad de este marcador molecular para identificar diferencias entre poblaciones de la misma especie.

En relación a este marcador molecular, Arinichi y Okimoto (2005) diseñaron oligos para amplificar por PCR la región control del ADN mitocondrial de *C. gigas*. Estos oligos fueron probados en 29 organismos cultivados seleccionados y amplificaron para 22 haplotipos con una tasa de sustitución de bases del 0.998. En otro trabajo, Boom *et al.* (2011) evaluaron las diferencias genéticas en las poblaciones ferales de *C. gigas* en Canadá. Ellos tomaron en cuenta que la especie fue introducida desde 1927 hasta 1977, de una población silvestre de Miyagi, Japón. Utilizando la región control del ADN mitocondrial determinaron que existe una alta tasa de variabilidad genética entre los organismos muestreados ya que se encontraron 42 haplotipos diferentes en 141 organismos seleccionados al azar. Reportaron dos haplotipos en particular con una alta frecuencia, de igual manera no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de los alelos en las poblaciones.

Existen aportaciones sobre variabilidad genética mitocondrial en otras especies como *C. virginica*. En este sentido, Reeb y Avise (1990) analizaron la distribución de la especie en Estados Unidos utilizando la región control mitocondrial de ostiones nativos de las costas de Texas y de Florida y encontraron 82 haplotipos en una muestra total de 212 ostiones. Las variaciones en los alelos encontrados no fueron significativas entre las poblaciones de estudio, por lo que concluyeron que no había evidencia de estructuración genética poblacional en *C. virginica* en los Estados Unidos. Más recientemente, Kawamura *et al.* (2017) analizaron poblaciones silvestres de *C. gigas* de las costas de Japón a partir de secuencias del gen NADH deshidrogenasa 5 (ND3) y reportaron una alta diversidad genética pero con una limitada diferenciación genética entre las poblaciones.

I.3.3. Microsatélites

Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases (Hancock, 1999). Este tipo de secuencias se han encontrado tanto en genomas eucariontes como procariontes e incluso se han identificado en genomas de mitocondrias y cloroplastos. Los microsatélites se distribuyen en regiones no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, por lo tanto, son regiones

adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional (Zane *et al.*, 2002). Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (desde 10^{-6} hasta 10^{-2} mutaciones por sitio por generación) que se atribuye a eventos de inserciones y eliminaciones durante la replicación del ADN. Debido al alto grado de polimorfismo en el tamaño y a que estos marcadores son codominantes, pueden ser estudiados como electromorfos, lo cual reduce el tiempo y el costo de la técnica en los casos en los que es necesario estudiar numerosas muestras y múltiples loci.

Los microsatélites son marcadores moleculares ampliamente utilizados para identificar diferencias genéticas incluso a nivel individuo. El grado de eficiencia de estos marcadores es tal que son utilizados para realizar pruebas de paternidad. Existen trabajos donde se evalúa la variabilidad genética de poblaciones de *C. gigas* a partir de microsatélites. En este sentido, Li *et al.* (2006) analizaron la variabilidad genética de cinco poblaciones cultivadas diferentes en China, utilizando siete loci microsatelitales. Ellos identificaron el grado de diferenciación alélica y la heterocigosis. Estos autores encontraron un número promedio de alelos por locus entre 19 y 26 y valores de heterocigosis esperada entre los 0.456 y 0.926, lo cual indica una estabilidad genética en la población. También realizaron pruebas de distancias genéticas y pudieron deducir que las poblaciones cultivadas en el norte son diferentes genéticamente a las cultivadas en el sur de China.

Huvet *et al.* (2004), determinaron la tasa de hibridación entre *C. gigas* y *C. angulata*, tomando en cuenta que se ha demostrado que son especies muy cercanas. Estos autores emplearon 8 microsatélites, de los cuales 5 fueron consistentes para un taxón con menos pares de bases que los reportados para las dos especies, lo cual hacía suponer una hibridación natural. Posteriormente se secuenciaron los 5 microsatélites que mostraron indicios de hibridación, encontrando mutaciones severas y concluyeron que probablemente se deba a genes nulos y homoplastia. Empleando genes mitocondriales descubrieron que existe hibridación entre *C. angulata* y *C. gigas* en dos de las poblaciones silvestres de *C. angulata* estudiadas en Portugal por lo que este es el primer reporte de la hibridación natural de estas dos especies. Otro estudio en donde el estudio poblacional con microsatélites es complementado con ADN mitocondrial es el de Kawamura *et al.* (2017), ya mencionado en subcapítulo anterior.

En México las aportaciones sobre evaluación de variabilidad genética de *C. gigas* empleando microsatélites son escasas. Grijalva-Chon *et al.* (2013) analizaron la variabilidad genética de los organismos utilizados como reproductores por el CREMES. En una muestra al azar de 73 organismos encontraron 66 alelos y un total de 146 haplotipos en la muestra de los reproductores y 68 alelos y 168 haplotipos en su descendencia, así como una heterocigosis observada de 0.65 para la muestra de los reproductores y 0.67 para la muestra de la descendencia, sin diferencia significativa entre ambas muestras. Además, todos los loci, a excepción de uno en la descendencia, mostraron deficiencias de heterocigotos según el modelo de Hardy-Weinberg, pero no se encontraron evidencias de endogamia acumulada. Ellos concluyeron que el número bajo en la heterocigosis es común en la especie y mayormente en especies cultivadas, ya que el control sobre la variabilidad genética no es considerado por los laboratorios productores.

Los marcadores moleculares juegan un papel importante en el desarrollo de la acuicultura desde la perspectiva de evaluar la variabilidad genética de las especies de interés, principalmente porque es un atributo fundamental en el rendimiento de los cultivos, así como en la resistencia a los patógenos y a las fluctuaciones ambientales de las zonas de cultivo. Sin embargo, en el caso particular de *Crassostrea gigas* en México, la variabilidad genética no es monitoreada por los laboratorios productores de semilla, pero que debería de ser uno de los criterios a considerar para evaluar la calidad de la semilla.

I.4. Patógenos de moluscos bivalvos

El ostión japonés presenta generalmente buena resistencia a patógenos, sin embargo, existen registros de infecciones principalmente por herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1), *Perkinsus marinus* y *Marteilia refringens*, los cuales están tipificados como los patógenos con mayor incidencia en cultivos tanto en México como en el mundo (Cáceres- Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008). El primer estudio en América sobre afectación de patógenos en organismos del género *Crassostrea*, se registró en Estados Unidos y el Golfo de México durante 1946 debido a que se presentaron altas mortalidades de ostiones de la especie *C. virginica*, principalmente asociándolas a bacterias y a contaminación del agua (Ray, 1996).

El primer reporte de OsHV-1 se registró en 1972 en los Estados Unidos causando altas mortalidades en poblaciones silvestres de *C. virginica* (Farley *et al.*, 1972). Posteriormente, en larvas de *C. gigas* se presentaron las primeras infecciones en 1991 en Nueva Zelanda y en 1992 en Francia (Nicolas *et al.*, 1992). En México, Grijalva-Chon *et al.* (2013) y de la Re-Vega *et al.* (2017) reportaron nuevas variantes de OsHV-1 en las costas de Sonora.

Posteriormente, se detectó la presencia de *Perkinsus marinus* en ostiones nativos (*C. virginica*) en los sistemas costeros del Atlántico en Estados Unidos y México (Ford, 1996). Desde los primeros registros de aparición de *P. marinus*, se han encontrado nuevas especies, entre las que destacan *P. olseni* que infecta generalmente abulones en la zona costera de Australia (Lester y Davis, 1981); *P. atlanticus*, descubierta en almejas de Portugal donde causó altas mortalidades (Azebedo, 1989); *P. chesapeakei* (McLaughlin *et al.*, 2000) y *P. andrewsi* (Coss *et al.*, 2001) reportados en Estados Unidos. En el caso de México existen reportes de este patógeno en las costas de Sonora y Sinaloa (Cacerés-Martínez *et al.*, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Cáceres-Martínez *et al.*, 2012; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015; Martínez-García *et al.*, 2017).

En lo que respecta a *Marteilia refringens*, los primeros registros de infección en moluscos fueron reportados por Herrbach (1971), y Alderman (1979) en *C. gigas* de Europa, particularmente en Inglaterra (Cahour, 1979) y en España (Montes *et al.*, 1998). Se han reportado otras especies de *Marteilia* destacando su alta patogenicidad, como *M. sydneyi* y *M. lengehi* reportadas en Australia (Kleeman y Adiard, 2000). En México se ha reportado la presencia de *M. refringens* en el Golfo de California y que de hecho viene a ser el primer registro para el Pacífico Americano (Grijalva-Chon *et al.*, 2015; Martínez-García *et al.*, 2017).

La determinación de la prevalencia de patógenos en los laboratorios productores es muy importante ya que patógenos como OsHV-1 provoca mortalidades masivas en etapas tempranas del desarrollo. En México existen comités de sanidad estatales que monitorean la sanidad de los laboratorios productores, por lo que la inocuidad de las semillas ofertadas a los ostricultores es un elemento esencial en la evaluación de la calidad de la semilla.

I.5. Variabilidad ambiental y desempeño biológico

Las tasas de crecimiento y supervivencia de *C. gigas*, están influenciadas por diversos factores ambientales entre los que destacan la temperatura, la disponibilidad de alimento y las densidades de siembra. Las variaciones ambientales se ven reflejadas en las fluctuaciones del crecimiento de *C. gigas*, y la tasa de reproducción y supervivencia de esta especie está ligada a la estacionalidad en los parámetros del agua (Brown, 1988).

En este sentido, la temperatura esta intensamente relacionada al crecimiento. En México existen trabajos sobre la influencia de este parámetro en cultivos de *C. gigas* (Castillo-Durán *et al.*, 2010) en donde se ha reportado que las altas temperaturas disminuyen la tasa de crecimiento. Así mismo, Sicard *et al.* (2006) señalan que la temperatura óptima para el crecimiento de *C. gigas* es de 19 °C. De igual manera, la calidad del agua en función del oxígeno disuelto y nutrientes inorgánicos como nitrato, nitrito, amonio y ortofosfato influyen en la supervivencia y crecimiento de *C. gigas*. (Dridi *et al.*, 2007).

En México, el ostión japonés se cultiva fundamentalmente en cajas ostrícolas (cultivo en suspensión) y en costales de cultivo (Chávez-Villalba, 2014). Los estudios sobre crecimiento son diversos, en México la tasa de crecimiento de *C. gigas* es una de las más rápidas a nivel mundial, con tasas entre 0.221-0.290 mm/día según lo reportado por Islas-Olivares *et al.* (1982), Cáceres-Martínez *et al.* (1990) y Castillo Durán *et al.* (2010), alcanzando la talla comercial en un ciclo de producción de un año. La tasa de crecimiento de *C. gigas* en otros países como Australia es de 0.0078 mm/día, mientras que, en Nueva Zelanda, Handley (2002) reporta una tasa de crecimiento de 0.117 mm/día. En Francia la tasa de crecimiento para *C. gigas* es de 0.0119 mm/día (Gangnery *et al.*, 2003).

Los parámetros del agua juegan un papel importante en el crecimiento y la supervivencia de *C. gigas*, en este sentido se sabe que es una especie que presenta un amplio margen de adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, existen reportes de la relación de las altas temperaturas y los eventos de mortalidades en cultivos (Calvo *et al.*, 1999). A pesar de ser una especie originaria de aguas templadas (Japón, regiones noroeste del Pacífico), se ha reportado crecimiento en aguas cálidas y tropicales (Kobayashi *et al.*, 1997; Gangnery *et al.*, 2003). Otro aspecto a considerar en la sobrevivencia y crecimiento es la salinidad. Nell y

Holliday (1988) señalan que en estado larval el crecimiento y la supervivencia óptima de *C. gigas* en Australia se logra entre las 19 y 27 unidades.

El oxígeno disuelto influye directamente en el crecimiento de *C. gigas*, se ha estimado que la especie puede adaptarse a concentraciones bajas de oxígeno disuelto, principalmente por la naturaleza de su proceso respiratorio ya que al filtrar el agua genera movimiento de convección el cual oxigena el agua (Samain, 2011). Existen reportes dentro de los primeros cultivos comerciales de la especie, que afirman que una cantidad mayor de 9.5 mg/L de oxígeno disuelto puede afectar considerablemente su crecimiento (Loosanoff, 1965). La cantidad de materia orgánica que se oxida en el área de cultivo puede ser un factor determinante para la variación de este parámetro, de igual manera la materia orgánica juega un papel importante en las tasas de desarrollo de la especie, y es un factor a considerar al elegir un área de cultivo.

La disponibilidad del alimento para los cultivos comerciales es a menudo un factor limitante en su desarrollo y modifica las tasas de supervivencia y de crecimiento de los ostiones cultivados, de igual manera las tasas de materia orgánica influyen en su supervivencia (Barillé *et al.*, 1997).

Respecto a los laboratorios, la calidad del agua es un aspecto a evaluar en los criterios de calidad. Si bien es cierto que los laboratorios ofrecen condiciones controladas, es necesario diagnosticar la cantidad de materia orgánica y contaminantes que puedan afectar el protocolo de producción de las semillas y su desempeño en campo.

I.6. Teoría de la información: Enfoque de multimodelos

La implementación de modelos de crecimiento en pesquerías es una herramienta útil para determinar las tallas, tiempos y volúmenes de producción para una especie en una zona determinada. Desde el enfoque acuícola, el contar con una herramienta que permita modelar el ciclo de vida de especies de interés es determinante para la sustentabilidad de esta actividad económica (Burnham y Anderson, 2002).

El modelaje del crecimiento de *C. gigas* y otras especies comerciales se realiza generalmente mediante el ajuste del modelo de von Bertalanffy (vB) descrito por la ecuación:

$$L_{(t)} = L_{\infty} (1 - e^{-k(t-t_0)})$$

dónde:

$L_{(t)}$ = Longitud en tiempo

L_{∞} = Longitud máxima teórica

k = Constante de crecimiento

t_0 = Edad hipotética cuando L es 0

Los trabajos sobre la teoría de la información y el enfoque multimodelos para describir el crecimiento de *C. gigas* son escasos. Góngora-Martínez y Aragón-Noriega (2017) compararon los modelos von Bertalanffy y el von Bertalanffy estacional, para determinar el patrón de crecimiento del ostión japonés, determinando que el modelo estacional representa mejor ajuste para la especie.

Existen antecedentes de la aplicación de esta técnica en diversas especies en México. Particularmente para el género *Crassostrea*, Chávez-Villalba y Aragón-Noriega (2015) modelaron el crecimiento individual de *Crassostrea corteziensis*, en la región del centro del Golfo de California, utilizando cinco modelos de crecimiento, (1) von Bertalanffy, (2) Gompertz, (3) Estacional, (4) Logístico y (5) Schnute-Richards. Concluyeron que el modelo Schnute-Richards es el que mejor describió el crecimiento de la especie y cuya ecuación es la siguiente:

$$L_{(t)} = L_{\infty} (1 + \delta e^{k^4 t})^{1/\gamma}$$

dónde:

$L_{(t)}$ = Longitud en tiempo

L_{∞} = Longitud máxima teórica

k = Constante de crecimiento

t = Edad a la talla $L_{(t)}$

t_0 = Edad hipotética cuando L es 0

δ t γ = Parámetros adimensionales

Similarmente, Hidalgo-de la Toba *et al.* (2015) utilizaron esta técnica para elegir el modelo más apropiado para describir el crecimiento y la estructura poblacional de la almeja sifón *Panopea generosa*, pero ellos emplearon los modelos (1) von Bertalanffy, (2) Gompertz, (3) Johnson, (4) Logístico y (5) Schnute, encontrando que el modelo más apropiado fue el modelo Johnson. El modelo se describe con la siguiente ecuación:

$$L(t) = L_{\infty} e^{-[1/k(t-t_0)]}$$

dónde:

$L(t)$ = Longitud en tiempo

L_{∞} = Longitud máxima teórica

k = Constante de crecimiento

t = Edad a la talla $L(t)$

t_0 = Edad hipotética cuando L es 0

En el callo de hacha *Atrina maura* (Aragón- Noriega, 2013) y en la almeja de sifón *Panopea globosa* (Aragón-Noriega *et al.*, 2014), los modelos que mejor describieron el crecimiento fueron el de von Bertalanffy y Gompertz respectivamente, este último descrito por la ecuación:

$$L(t) = L_{\infty} e^{-e^{-k(t-t^*)}}$$

dónde:

$L(t)$ = Longitud en tiempo

L_{∞} = Longitud máxima teórica

k = Constante de crecimiento

t_0 = Edad hipotética cuando L es 0

β y γ = Parámetros adimensionales

1.7. Índice de condición

Una forma de evaluar la condición fisiológica de *C. gigas* es determinando el índice de condición, el cual genera información del estado nutricional del organismo, el valor comercial y es un estimador de la salud de los cultivos (Baghurst y Michell, 2002). Existen diferentes fórmulas para determinar este indicador biológico, Crosby y Gale (1990) realizaron una revisión

de los diferentes índices de condición y las modificaciones que han realizado diversos autores según las necesidades de cada investigación y donde se propone esta metodología como un estimador de la condición fisiológica de los bivalvos. Linehan *et al.* (1999), utilizaron tres índices de condición para evaluar la condición fisiológica y su variabilidad estacional en cultivos comerciales de *C. gigas*. Los índices que compararon son los propuestos por:

1) Imai y Sakai (1961), con la ecuación:

$$IC = \text{espesor} * [0.5(\text{largo} + \text{ancho})]^{-1}$$

2) Booth (1983), descrito con la ecuación:

$$IC = \text{peso seco} * \text{peso total}^{-1}$$

3) Walne (1976), descrito con la ecuación:

$$IC = \text{peso carne seca} * \text{peso de la concha seca}$$

Los resultados de los índices determinaron que existen variaciones estacionales en las poblaciones estudiadas, particularmente durante la estación de verano en relación con el invierno y se concluyó que estas fluctuaciones pueden estar relacionadas con el crecimiento del organismo y el inicio de la gametogénesis.

En México existen aportaciones sobre esta disciplina, particularmente Gallo-García *et al.* (2001) utilizaron el índice de condición propuesto por Crosby y Gale (1990), con la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{PS * 1000}{PV - PSV}$$

dónde:

PS = Peso corporal seco (g)

PV = Peso vivo húmedo total (g)

PSV = Peso seco de la concha (g)

El índice anterior mostró sensibilidad al detectar variaciones entre las poblaciones cultivadas de *C. gigas* en Barra Navidad, Nayarit, y dichas variaciones fueron relacionadas a las diferentes tasas de madurez sexual de los organismos muestreados.

Por otra parte, Barraza-Guardado *et al.* (2009) determinaron la variación estacional del índice de condición de las semillas producidas en el CREMES en Sonora, México, y la ecuación que describe al índice fue:

$$IC = \frac{MO}{PST} * 100$$

dónde:

MO = Materia orgánica (g)

PST = Peso seco total (g)

Este índice demostró que existen diferencias estacionales entre los organismos muestreados, con los mayores valores en invierno, mientras que los menores fueron en verano, siendo estadísticamente diferentes entre sí. Por otro lado, los valores de otoño fueron mayores a los observados en primavera, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estas dos estaciones. Ese trabajo es relevante ya que no es común el empleo de índices de condición en semillas (postlarvas) de *C. gigas*, la mayor parte de los trabajos se aplican a juveniles o adultos.

Castillo-Durán *et al.* (2010) utilizaron el índice de condición descrito por Walne y Mann (1975), para evaluar el crecimiento de *C. gigas* y *C. corteziensis* cultivados en Sonora, México. El índice utilizado fue:

$$IC = \frac{P1 * 1000}{P2}$$

dónde:

P1= Peso seco del tejido blando (g)

P2 = Peso seco de la concha (g)

Este índice señaló poca variación durante el verano y una variación más amplia en invierno. La variación del índice de condición en *C. gigas* está influenciada por factores

ambientales, variabilidad genética, patógenos, tecnología de cultivo, densidad de siembra, entre otros. Sin embargo, existe una relación directa entre las variaciones de los valores del índice de condición y el inicio del desarrollo sexual ligado a la gametogénesis (Boscolo *et al.*, 2003).

Los aspectos descritos anteriormente intervienen en el protocolo de producción de semillas de *C. gigas* y a su vez son elementos fundamentales para describir su calidad. Evaluando estos elementos e identificando las problemáticas puntuales de las etapas del protocolo de producción es posible generar los criterios para evaluar la calidad de los sistemas de producción y las semillas que ofrecen a los ostricultores.

Es importante destacar que después de muchas décadas de que el ostión japonés se introdujo a varios países fuera de su área geográfica de origen, no existe una evaluación seria que defina los criterios de calidad que se deben de considerar para la producción de semilla de calidad.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Evaluar de los factores críticos en la producción de semilla de ostión *Crassostrea gigas* que influyen en su desempeño en cultivo.

II.2. Objetivos particulares

- 1) Identificar los puntos críticos en los protocolos de producción de los cuatro laboratorios productores de semilla participantes en este estudio.
- 2) Diseñar un esquema de evaluación que incluya los criterios de la calidad deseable en las semillas de ostión japonés y ponerlo a prueba en los cuatro laboratorios del estudio.
- 3) Determinar la variabilidad genética de las semillas provenientes de cada laboratorio.
- 4) Conocer la prevalencia de *Marteilia refringens*, herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHV-1) y *Perkinsus marinus*, en las semillas en la etapa de laboratorio y durante su cultivo en el mar.
- 5) Evaluar el crecimiento, supervivencia e índice de condición de las semillas provenientes de cada laboratorio durante su cultivo en el mar.
- 6) Registrar la variabilidad de los parámetros del agua en la zona del cultivo en el mar y relacionarlo con el crecimiento de las semillas.
- 7) Modelar el crecimiento individual mediante el enfoque de la teoría de la información y el enfoque multimodelo de las semillas provenientes de cada laboratorio.

III. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis generaron varios manuscritos de los cuales varios fueron aceptados para su publicación en diversas revistas científicas y otros se encuentran en proceso de evaluación o acaban de ser sometidos. La Tabla 2 indica la relación de los trabajos anteriores en función de los objetivos particulares de la tesis y cual es su estatus hasta la fecha.

Tabla 2. Relación de artículos científicos en función de los objetivos particulares de esta tesis.

Objetivo particular	Título del artículo	Condición
1 y 2	Designing a protocol to evaluate <i>Crassostrea gigas</i> spat production in hatcheries: identifying critical points	Sometido a Aquaculture Engineering
3	¿Son 45 años de aislamiento reproductivo suficientes para impedir la amplificación de genes mitocondriales en el ostión del Pacífico?	En revision en Aquatechnika
4, 5 y 6	Biological performance of <i>Crassostrea gigas</i> stocks produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions.	Aquaculture Research, 50(2): 621-633. 2019
	Influencia de la variabilidad ambiental del estero La Cruz (Sonora), en el crecimiento y condición del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> .	Biocencia, 21(2): 62-70. 2019.*
7	Multi-model inference as criterion to determine differences in growth patterns of distinct <i>Crassostrea gigas</i> stocks.	Aquaculture International. En prensa. https://doi.org/10.1007/s10499-019-00396-0

* Una versión divulgativa fue publicada en Panorama Acuícola Magazine, 24(4): 26-35. 2019. Ver Apéndice.

**DESIGNING A PROTOCOL TO EVALUATE *Crassostrea gigas* SPAT PRODUCTION
IN HATCHERIES: IDENTIFYING CRITICAL POINTS**

Sometido a Aquaculture Engineering

Felipe de Jesús Reynaga-Franco¹, José-Manuel Grijalva-Chon¹, Reina Castro-Longoria¹,
Ramón-Héctor Barraza-Guardado¹, José-Alfredo Arreola-Lizárraga², Jorge Chávez-Villalba²

¹Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Av. Luis
D. Colosio s/n, Hermosillo, Sonora 83000, México.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Sonora, Apdo. Postal
349, Guaymas, Sonora 85454, México.

Correspondence

Chávez-Villalba J., Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad
Sonora, Apdo. Postal 349, Guaymas, Sonora 85454, Mexico. E-mail: jechavez04@cibnor.mx

Running title: A protocol to evaluate the production of oyster spat. Analyzing production of
Pacific oyster spat

Abstract

The oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) is one of the most important species in the world for shellfish aquaculture, and great part of cultivation activities rely on the use of spat produced in hatcheries. This spat is often associated to high mortalities and low yields during field cultivation but this aspect has been little studied. A survey was implemented in four different hatcheries in Mexico to evaluate the production practices. In this sense, this paper analyzes 31 points of the different phases of *C. gigas* spat production. Results showed that hatcheries operate with an intermediate control of the processes presenting six critical points (lowest rating), seven points of attention (low-intermediate values), 15 points where at least one hatchery applies the best alternative for production, and only three points where all the hatcheries scored the highest. Major concerns are; the few oysters used in the spawning processes, that there is no control of the crosses between them or with other oyster lines, and that genetic analyzes are never done. Likewise, pedigree of broodstock is not documented and the genetic variability of spat is unknown. Additional concerns are that hatcheries exhibit no control in estimates of number of gametes produced nor in fertilization, hatching, settlement, survival rates obtained. More issues were identified and analyzed where hatcheries would improve or progress in their production processes. The findings could be a reflection of what happens in other countries with similar practices for oyster spat production. Potential areas for future research are also identified.

Key words: broodstock, gametes, genetics, larvae, microalgae

Introduction

Aquaculture is the industrial activity of food production that presents the highest growth in the world with 6.9% annually (FAO, 2008). Shellfish aquaculture is one of the most important representing 23.6% in 2010 with 14 million tons of clams (34%), oysters (32%) and mussels (13%) as the main groups (FAO, 2016). Among oysters, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) is the principal species and denotes 97% of the cultivated organisms with a global production of 625,925 tons in 2014 (FAO, 2016; Azéma *et al.*, 2017). The leading producers of Japanese oysters are China, Japan, Korea, France and United States; in this country, the species symbolizes an industry of 277 million US dollars and more than 15,000 jobs (FAO, 2016).

Due to its high tolerance to environmental conditions and a high potential for rapid growth, the Pacific oyster is present in practically all the seas of the world; it has been introduced in more than 60 countries and in many of them is currently cultivated as non-native species (Diederich *et al.*, 2004; Miossec *et al.*, 2009). Much of this success is because the species is highly fecund and easy to reproduce in hatcheries (specialized production centers) (Guo, 2009). Today, *C. gigas* is one of the most important bivalve species produced by artificial reproduction (Corporeau *et al.*, 2012). Hatcheries produce seed and/or spat, which are terms applied to the early juvenile stage of bivalve development (spat is the term preferred in this document) (Helm *et al.* 2004). The spat can be acquired in many hatcheries around the world allowing oystermen and interested producers to carryout trials for introductions into new regions each year.

Pacific oyster farming traditionally relies on spat collected from the wild (Boulais *et al.* 2015), but the success of wild spat collection is out of control of aquaculturists and mostly depend on environmental, biological and anthropogenic factors (Marshall *et al.*, 2010). Nevertheless, hatcheries emerged as an alternative to artificially extend the breeding season of commercially important species and to address problems where natural spat collection is not possible, has decreased, or presents variability of natural spat recruitment from year to year (Robert and Gerard, 1999; Frias and Segovia, 2010; Chávez-Villalba, 2014). A fact is that unpredictable juvenile supply put at risk the availability of sufficient quantity of spat for cost-effective cultivation activities. Thus, the importance of oyster spat production in hatcheries has increased since they are needed to complete the natural spat supply for the shellfish industry (Boulais *et al.*, 2015). The dependency of spat from hatcheries can represent a great part of the

total oyster production in some countries, for example it is around 40% in France, up to 80% in China, and it is 100% in Mexico (Guo *et al.*, 1999; Chávez-Villalba, 2014). Nations not having commercial oyster hatcheries force farmers to use imported spat stocks produced in hatcheries of other countries. For example, oyster farming in South Africa depends on spat from hatcheries in Chile, Namibia, and United Kingdom (Nel *et al.*, 2014). Thus, hatcheries are essentials for supplying spat to maintain oyster production levels worldwide.

Hatcheries, as any company, should offer quality products that meet the needs of customers. This implies that oyster spat should present, among other things, an appropriate size, good physiological condition, and be free of pathogens to ensure suitable development when is transferred to the field for cultivation. Nevertheless, reproductive success and profitability of hatcheries remain inconsistent (Corporeau *et al.*, 2012). For example, it is possible that the performance of a spat lot it is not what was expected and presents problems. When there is an issue with a recently acquired spat lot, oyster farmers use to believe they got a low-quality product. In accordance with testimonies of some oystermen and literature, the most mentioned obstacles for a normal development of spat are high mortalities after seeding, slower growth rates than usual, and oysters that do not grow and stay small (dwarfism) (Uriarte *et al.*, 2008). In general, these issues and other problems with the spat are not reported in the scientific literature and they are just registered in logbooks or reports but without a further follow-up. A common practice when a farmer is observing recurrent “low-quality” spat coming from a specific hatchery, they simply look for another provider and buy in a different hatchery. In the present time is possible to find many hatcheries around the world offering a variety of products, but price, availability and freedom from disease are the main criteria for choice, rather than quantified yield (Nel *et al.*, 2014).

Surprisingly, despite the economic and social importance of the Japanese culture of oysters and their high technology, there is no formal methodology to evaluate the quality of the spat produced in the hatcheries. There are several guides and technical manuals that describe the stages of the oyster production process, but hatcheries adjust these guides to its infrastructure, geographical location and technical capacity, generating infinity of adjusted or modified protocols, that favor variations in spat quality they produce and therefore their biological performance (Reynaga-Franco *et al.*, 2019).

As a first approach to a methodology to evaluate the spat produced in hatcheries, this paper presents a protocol based on the analysis of 31 main components of the bivalve spat production phases. This protocol was tested with information from four oyster hatcheries in northwestern Mexico. The purpose of this work is to determine the relevance and practicality of the proposed protocol, based on it identify and discuss the critical points in spat production, provide useful evidence, formulate some general conclusions and identify potential areas for future research.

Material and methods

Production protocol design

The protocol was designed for general aspects, as well as common practices (routines) in each of the sections and in the different stages of production of each hatchery. To evaluate, we assign a score according to the level of control observed in the different stages of production. The scores awarded were based on the values suggested and reported in the FAO manuals and guides and other scientific sources in relation to the breeding of bivalves (Utting and Spencer 1991, Helm *et al.*, 2004, Sarkis and Lovatelli, 2007).

We use the following scores; 1 - poor, 2 - below average, 3 - average, 4 - good and 5 - the best alternative, for the items where five alternatives were accessible; 1 - poor, 3 - average and 5 - best alternative, for the items where there are three options available; and 1 - poor and 5 - better alternative, where there were only two possibilities. Table 1 shows the items that were considered and the criteria to evaluate them.

Selection of participating hatcheries

In Mexico, Pacific oyster production is concentrated in the northwestern area of the country, including the states of Baja California, Baja California Sur, Sonora and Sinaloa (Chávez-Villalba, 2014). In this study, we counted on the collaboration of the most experienced laboratories (more than 15 years of uninterrupted operation), named H1, H2, H3 and H4 for identification purposes (See Reynaga-Franco *et al.*, (2019) for details of the geographical location of the hatcheries).

Evaluation of hatcheries based on the proposed protocol

To evaluate the hatcheries, using the protocol proposed here, three-day stays were scheduled in each of the participating. polls and Interviews were conducted with the staff to know the general operability, and taking photographs when allowed to document all production processes.

Results and discussion

Evaluation

The results of the evaluation of hatcheries are presented in Table 2. This allowed us to identify six critical points corresponding to the items where all the hatcheries scored the lowest values. Also, we identified seven points of attention where hatcheries recorded low - intermediate values indicating that their procedures could be improved. Then we found 15 points where at least one hatchery applies the best alternative for production and therefore this scored the highest rating. Finally, we found just three points where all the hatcheries use the best alternative for production.

In addition to the information generated from the polls and interviews, the operations of each area within the hatcheries were documented, providing relevant complementary information. We detect that the hatcheries staff deal with a variety of problems every day, but most of them are not documented or disclosed. According to the technicians of the hatcheries, even when the oyster spat production is something routine, every spawning induction event to obtain the spat is a challenge. Some common problems are: insufficient number of broodstock, low fertilization rates, deficient settlement, failures in microalgae cultures, presence of pathogens, and equipment malfunction. Every point was analyzed and reviewed supported by data from internal reports and logbooks well as personal communications and interviews with the staff.

Production system

1. Operational systems

In this point hatcheries showed variation in their operational systems. While H1 and H2 combine semi-open with open systems, H4 combine semi-open with closed systems. In contrast, H3 is the only using totally closed systems. Comparatively, the functionality of the facilities of

H3 allows a greater efficiency in production, as well as greater controls within each stage. This is an advantage for the production of spat.

2. Automation level

Similar to previous point, automation level showed variation depending on the hatchery. Almost all the processes of H1 and H2 are manually operated, although in some phases, they implemented semi-automated practices as for example the food supply in the nursery. Although H4 also combine procedures, their manual operations are less numerous than in the other hatcheries. In the case of H3, all the procedures are automated (water exchanges, feeding of organisms, water temperature, etc.), which represents an advantage over the other hatcheries in terms of efficiency.

3. Water quality

For successful operations hatcheries must ensure that good water quality exists most of the time in all the areas of production. Thanks to the automation of processes, H3 can monitor water quality three or more times daily being this one of the most efficient alternatives. Nevertheless, the other hatcheries use to register the variables at least two times daily, what represents also a good control with respect to the monitoring of water quality. In terms of bacteriological tests, operators do not spend much time or anything on this aspect because H1, H2 and H4 never carry them out and H3 does them occasionally.

4. Sanitary (pathogens) certification by government agencies

There are several pathogens that represent a threat to hatcheries since they produce high mortalities in larvae, juveniles and adults. One of the pathogens that is causing more problems is OHsV-1. This is the etiological agent of a highly prevalent viral infection affecting and producing severe mortalities in all life stages of *C. gigas* worldwide (Pernet *et al.*, 2012; Renault 2016). Ostreid herpesvirus type 1 affects spat more severely than adults (Peeler *et al.*, 2012) and losses can be near total (Segarra *et al.*, 2010). Diseases of farmed molluscs (oysters, scallops and abalone) represent losses up to US \$2 billion each year (Green *et al.*, 2016).

Operators of all the hatcheries indicated that pathogens represent an important issue for the proper functioning of their facilities and that everyone had ever experienced a problem with

mass mortalities due to pathogens. Hatcheries in Mexico are required by law to perform analyses of pathogens on broodstock, larvae and spat. In this sense, all hatcheries of this study meet this requirement by sending samples for pathogen analysis, but the tests are restricted to detect only OHsV-1. However, other pathogens as *Marteilia refringens* and *Perkinsus marinus* have been reported affecting production in hatcheries and commercial cultivations of *C. gigas* in the Gulf of California (Grijalva-Chon *et al.*, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2017). This makes necessary that official analyzes extend and include the identification of other pathogens to avoid dispersion of diseases and possible mortality outbreaks in oyster farms.

5. Sanitary (pathogens) certification by private diagnostic laboratories

Hatcheries in Mexico have the possibility to perform analyzes of pathogens in institutions other than official agencies that may corroborate the presence of OHsV-1 but also detect other pathogens. H1, H2 and H4 occasionally perform additional analysis but H3 is the only one that sends samples to a third-party laboratory of each one of the lots produced to detect additional pathogens. This indicates that H3 is committed to producing spat with higher sanitary standards. No hatcheries reported problems due to the presence of pathogens, indicating that in general, the examined hatcheries are producing healthy spat.

Broodstock

1. Origin

Prime material for the operation of any hatchery is the broodstock (adult oysters capable to reproduce); they are obtained from the wild, commercial farms and/or from lots maintained specifically as breeding stocks. Broodstock could come from local sites, from areas that are more distant but within the same region, from remote locations but inside country limits, or from other nations (Sarkis, 2011). In many cases, and particularly when using non-native species, it is required to quarantine the stocks and rear the progeny in isolation (Helm *et al.*, 2004). The transport of broodstocks among sites are carried out by oystermen or through hatcheries, but today, the transfers have been limited and are under a strict control to avoid dispersal of diseases (Ishikawa, 2012). Other form of procuring broodstock is importing spat, putting it in cultivation to grow-out and then selecting the largest organisms with better growth. In general, hatcheries identify the origin of the broodstock by using oysters from a strict surveillance campaigns and/or

selective breeding programs (Langdon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2016). Nevertheless, some hatcheries seem to have difficulties implementing strict controls on the source of broodstock.

In our study, H1 and H2 explained that, in general, the original breeding oysters were imported from United States and currently, H1 uses local oysters from their own farm and H2 employs resident oysters but they use to exchange broodstock with other hatcheries. However, operators from these hatcheries emphasized that they have had difficulties to carry-out a precise control on the source of their breeding oysters. The former because the crosses among several lots are without a proper follow-up; often the lots, the crosses or the generations are misidentified; and sometimes occurs unintentional mixtures of oysters between different lines or specific lines with common cultivated oysters. Similarly, the origin of broodstock obtained from organisms that were imported as spat from other countries and then cultivated, is usually unknown. On the other hand, H3 and H4 have better control over the origin of their breeding oysters. For instance, H3 is the only utilizing oysters coming from selective breeding programs but they did not provide information about the traits by which these oysters are distinguished from common lines. In the case of H4, they use local oysters chosen from internal selection programs.

2. Selection

Among the advantages offered by hatchery-produced spat, are those related to genetic resources of commercial important species. Use and exchange of genetic resources of native and non-native bivalves are crucial for genetic improvement through interspecific and intraspecific hybridization (see review of Guo, 2009). Disease-resistant strains and improvements of desirable traits (weight, yield, and survival) are possible through family-based selective breeding programs. One of the species with more studies focused on this subject is the Pacific oyster (Miller *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016), and the investigations are currently performed in several countries as in the USA (Evans and Langdon, 2006), France (Dégremont *et al.*, 2010), China (Wang *et al.*, 2012), and Australia (Kube *et al.*, 2011).

As far as we know, in Mexico family-based selective breeding programs for *C. gigas* are carried-out only in the Aquaculture Genetics and Breeding Laboratory at CIBNOR (La Paz, Mexico). Because of intellectual property issues, the results of their genetically improved

oysters have not been published and information about these lines is restricted. We believe this laboratory provide with broodstock oysters to H3, who was the only hatchery to indicate that their oysters came from this type of programs. H4 began operations with broodstock from USA and currently has two oyster farms from which it selects its breeding oysters. H1 and H2 do not know the pedigree of their oysters and they select broodstock based on size, shape of the shell, and the growth rates observed in cultivation.

3. Stock of breeding oysters

This point is related to the previous two items. Here it is considered that the hatcheries should have large stocks of oysters of which their origin and pedigree is well-known. We obtained contrasting results considering that H1 has an intermediate knowledge of the origin, does not know the pedigree but has stocks with numerous breeding oysters. H2 presents the same conditions as H1 in terms of origin and pedigree, but has very small stocks of broodstock. On the contrary, H3 is the best qualified in terms of origin and pedigree but also its stocks of breeding oysters are very small. Finally, H4 has good control over the origin, they have an average control of the pedigree, and have stocks with numerous broodstock.

4. Condition of breeding oysters (size and weight)

Whether the broodstock come from the wild or cultivation activities, oysters are normally selected considering its general appearance (size, weight, shell morphology). For example, experienced operators prefer oysters >120 mm of shell length and/or >100 g of total weight for conditioning. The previous because larger oysters are normally fully developed organisms and females are usually present in higher proportions considering that Pacific oysters show protandric hermaphroditism as they mature first as males and then many change sex to females (Buroker, 1983). In this regard, H1 and H4 use oysters of around 100 mm shell size and an approximate weight of 150 gr. In contrast, H2 uses smaller breeding oysters with 60 mm shell size and a weight of 75 g. In the case of H3, although their oysters come from a selection program, they are small with dimensions similar to those used by H2.

5. Conditioning

Conditioning is the procedure to stimulate the maturation of broodstock and attain a spawning condition before and after the natural period when adults of the desired species are releasing mature gametes in the sea (Helm *et al.*, 2004). This practice is indispensable in the provision of larvae for culture and is the manner hatcheries are able to extend their production season (Utting and Spencer, 1991). The basic methods for broodstock conditioning are much the same for all bivalves and commonly consist in placing oysters in tanks at low density with high water flow maintaining elevated temperatures and a suitable food ratio. Gamete maturation and spawning in oysters is mainly controlled by temperature and food supply (Lango-Reynoso *et al.*, 2006). Therefore, the strategy for conditioning is keeping temperature and salinity close to values observed in nature when oocytes reach the mature stage (usually >20 °C and 15-35 of salinity).

The conditions to which females are exposed during conditioning have a significant effect on fecundity and on the quality of eggs subsequently spawned. For instance, variations in the time of conditioning induced large fluctuations in egg lipid levels in *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* (Gallager and Mann, 1986). In this sense, H1, H2, and H4 usually condition their oysters for four weeks, while H3 carries out a longer conditioning of six weeks. However, some operators indicated that they prefer not to perform any conditioning and instead of this, they get fully mature oysters from their stocks and spawn them immediately upon arrival at the hatchery. This allows them to save resources, but the spat production season depend on when there are mature oysters in the wild and planning becomes more inconsistent.

6. Evaluation of conditioning

When oysters are conditioning, it is necessary to know when organisms reach reproductive maturity and are ready to spawn. There are a number of ways of evaluating gamete development in bivalves and these normally include; 1- visual observation in relation to the relative mass, form and color of the gonads (Helm *et al.*, 2004), 2- gonad indices showing the relative weight (dry or wet) of the gonad to body weight (Sokolowski *et al.*, 2010), 3- stripping, where the gonad is cut with an scalpel and the gametes are recovered and examined microscopically to determine sex and their state of development (Chávez-Villalba *et al.*, 2002), and 4- histological examination of the gonad where development stages are related to certain

cytological characteristics (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2017). Of former methods, histology is preferred because it offers the most comprehensive information. Likewise, Lango-Reynoso *et al.* (2000) mentioned that the most complete approach would consist in combine at least two methods. In our study, the most common method is visual observation of the gonads in H1, H2, and H3, while H4 is the only hatchery to use histological techniques for evaluate conditioning.

Gamete production

Once the broodstock reaches a mature condition, it is necessary to induce spawning or look for a manner to obtain the mature gametes from the breeding oysters.

1. Number of breeding oysters in each spawning event

This is one of the critical points detected in this study. In practice, all the examined hatcheries indicated that they use a reduced number of oysters to induce them to spawn, and it is known that not all the organisms respond to stimuli so the actual number can decrease further. This is more understandable for H2 and H3 who have small stocks of broodstock (point 3 of conditioning). But even though H1 and H4 have larger lots, they place a few breeding oysters to spawn. Ideally, a large number of broodstock should be used to spawn to increase genetic variability.

2. Spawning method

There are three main methods used in hatcheries for obtaining the gametes; physical, chemical and mechanical. In the first two, the organisms are not sacrificed and can be conditioned and stimulated to spawn several times. In the mechanical is necessary to sacrifice the oysters to obtain the gametes. In general, the physical method is known as the thermal cycling procedure or thermo-stimulation and consist of exposing the organisms to changes in water temperature; oysters are maintained around 30-40 minutes at low (cool) temperature, then the water is drained and replaced with water at higher temperature. This water is drained after a similar time period and replaced with cooler water and the procedure is repeated several times. The importance is the differential between the lower and higher temperature, which will normally be about 10 °C (Spencer, 2008). The chemical method uses inducers such as potassium chloride, hydrogen peroxide, serotonin, etc., to provoke the spawning (López *et al.*, 2008).

However, this method is rarely beneficial since gametes liberated using such inducers are often less viable than with the other methods (Helm *et al.* 2004). The mechanical method is commonly known as “stripping” and is used in oviparous oyster species as *C. gigas* (Chávez-Villalba *et al.*, 2002). The procedure consists of open the oysters to expose the gonad to be cut repeatedly with a scalpel, then the gametes are washed with filtered seawater into a beaker or bucket containing seawater at culture temperature. Samples are examined microscopically to determine sex and the appearance of the gametes. This method reduces inbreeding risks because oysters are used only once and crosses can be made more carefully.

In the study, H1 and H2 combine spawning methods but they do not use them at the same time; they use one or the other depending on the number of organisms expected for spawning. In our results, H1 scored higher than H2 because they use more times the mechanical than the physical method. Instead, H3 prefers the physical method because they do not want to lose their breeding oyster that come from selection programs. In the case of H4, they were the best rated because they normally uses the stripping method favoring genetic exchange.

3. Number of spawning events for each breeding oyster

The thermal cycling procedure is one of the most used in hatcheries due to breeding oysters can be used for several spawning. Nevertheless, using a single broodstock over an extended period and for various spawning, results in reduction of lipid content in eggs and low larval yields through time (Gallager and Mann, 1986). Other situation of maintaining broodstock for several spawning operations is increasing the probabilities that organisms from the same parents will interbreed in the future. The risk of inbreeding is latent even when the high heterozygosity rate of *C. gigas* has been reported (Correa *et al.*, 2004).

Scoring in this item considered if the operators use the mechanical method more than the physical method. Thus, the score is greater for H1 than for H2 when comparing the times they reported to use mechanical over the other method because this is related to the number of times a breeding oyster is used to spawn. As indicated in the previous point, H3 only uses the physical method, therefore its oysters are spawned several times before being replaced by others. H4 is the only hatchery that never uses a breeding oyster more than once for spawning, which places it as the best in this aspect.

4. Crosses between different oyster lines

The operators of the four hatcheries stated that sometimes they cross oysters from different lines to try to favor genetic variability and in this way improve spat production. They bring oysters from other hatcheries, from other growing areas, or from their own stocks but employing organisms that had never been used before. However, in no case there is a formal follow-up of the new line of oysters created, and the follow-up is only concreted to ask the oyster farmers if they obtained better performance with that batch of organisms. Because of this, this is other critical point detected to produce oyster spat.

5. Gamete counting

The range of gamete production of a *C. gigas* female oyster can vary between 2 - 60 million in each spawn (Chávez-Villalba *et al.*, 2003), and this depend on the physiological state of the oyster, the time of year, and the environmental conditions (natural or artificial). Therefore, it is important to know the actual number of eggs produced by each female in every spawning run. Although this seems to be a routine that everyone does, it is not the case for H2 that never performs gamete counting and this part is done empirically. Operators of H1 and H3 signaled that they do not perform counting all the time, only when the workload allows them. In contrast, H4 has implemented this routine and it is performed in every run.

6. Fertilization and hatching rates

If counting eggs is important, it is also vital to calculate fertilization and hatching rates during each production run. When these rates are estimated, more accurate values of the production volumes are obtained, and therefore, is possible to calculate the subsequent yields of the different phases. This also allow to calculate production units as well as feeding volumes to avoid the waste of resources. However, these procedures are not carried out by any hatchery, they perform these phases empirically in every run. Some operators mentioned that, with the experience acquired over several years, they could calculate the yields without making the estimates. Others said that these are processes that consume a lot of time, so they prefer to spend their time on other tasks.

Larval culture

Culture of larvae comprises the management from the fertilized egg to the settlement phase. The most important factors during this production phase involves controlling the density of larvae carefully, provide feeding with the best cultured algae available, and keep cultures and equipment as hygienic as possible.

1. Culture density

High larval densities in culture conditions may result in reduced growth and high mortality because of competition for space and food and accumulation of metabolic wastes (Wang *et al.* 2018). On the contrary, low densities may affect costs and fail to meet the demand for mass production (Marshall *et al.*, 2014). In general, high embryo stocking densities conducts to anomalous development (Helm *et al.*, 2004). Similarly, D-larvae densities higher than 15,000 – 20,000 organisms L⁻¹, reduces growth and increases mortality (Cáceres-Martínez and Vásquez-Yeomans, 2014). Nevertheless, there are cases as that of Asmani *et al.* (2017), which obtained good performances (growth rate of 13 µm day⁻¹, survival of 87%, and metamorphosis of 50%) for *C. gigas* at a concentration of 50,000 larvae L⁻¹. On the other hand, the accumulation of metabolites produced by high larval densities may result in great increases in bacterial numbers. So this needs to be avoided by implementing complete water changes at regular intervals throughout the D-stage to the beginning of metamorphosis. We found in this study that larval densities used by H1, H2 and H3 are around 20,000 larvae L⁻¹ which is considered an average value. Nevertheless, H4 uses low larval densities (≈10,000 larvae L⁻¹) in their cultivations, which seems better for obtaining higher performances.

2. Survival

Estimate survival during larval culture is important to maintain production levels as well as to identify possible concerns related to the presence of pathogens or high waste loads. Accumulation of metabolites can result in great increases in bacterial numbers and bacteria of the genus *Vibrio* are implicated in mass mortalities of larvae. In general, larvae of *C. gigas* is more susceptible to pathogens since its immune system has not been fully developed during early developmental stages, leading to significant mortality in hatcheries (Song *et al.*, 2016). For instance, major hatchery crashes have been associated to the presence of *Vibrio tubiashii*

and *V. coralliilyticus* during larval culture of *C. gigas* (Richards *et al.*, 2015). Estimate larval survival should be a routine activity in any hatchery, but none of the hatcheries perform this activity. This makes it another critical point for spat production.

3. Settlement and metamorphosis

Settlement is the initial stage of metamorphosis and is characterized by larvae exploring the bottom of tanks for a suitable place to settle. Metamorphosis is the second stage and it is irreversible; it comprises substantial morphological and physiological changes from a swimming larva to a spat (Spencer, 2008). Settlement is a dynamic process where larvae actively respond to a wide range of variables or cues that may provide information to secure a site appropriate for its post-settlement growth and survival (Steinberg *et al.*, 2002). The process is affected by ecological, physiological, and molecular factors (Wang *et al.*, 2015). Some of these are related to microbial or bacterial biofilms, prey or predator, conspecifics, and macroalgal hosts (Hay, 2009). In oysters, one of the main factors on larval settlement is the presence of conspecifics (Diederich, 2005). This author found that recruitment of *C. gigas* larvae was higher on conspecifics and was similar on both living substrate and dead oyster shells. The settlement cue seems an insoluble glycoprotein in the organic matrix of *C. gigas* shells that acts as a chemical signal for larval settlement of conspecifics (Vasquez *et al.*, 2013). Therefore, setting oyster larvae on shell chips of conspecifics is the normally used method of producing cultchless spat in hatcheries of USA, France and Latin America (Robert and Gerard, 1999).

Before settlement and metamorphosis, the organisms go through different stages where there is a risk of high mortalities. Also, many larvae that set fail to survive metamorphosis, presumably because they have insufficient food reserves to complete this critical stage (Helm *et al.*, 2004). Until this point, the real number of oysters in production is relative. When organisms pass through the larval to the spat stage, it is the moment in which the number of oysters that can be considered for sale is more accurately known. That is why it is very important to estimate the real number of organisms that went through the metamorphosis and became a spat. However, this activity is not performed by any of the hatcheries, which makes it another critical point to produce *C. gigas* spat.

Culture of spat

The spat stage relates to bivalve larvae that have set and experienced metamorphosis (Helm *et al.*, 2004), and represents the moment when juveniles will eventually be transferred to the sea for cultivation (Hoyoz-Chairez, 2004). Hatcheries provide whether eyed pediveliger larvae or spat according to the preferences of the oyster industry. In some regions, pediveligers are used for remote setting at oyster farms; the farmers themselves set them and grow the spat using different methods. In other parts, hatcheries set the larvae and grow the spat until reaching certain size (normally from 1.0 mm onwards) that oyster farmers are comfortable to manipulate and grow (Helm *et al.*, 2004). This is the case for the four hatcheries examined.

1. Sizes

The capacity to grow spat needs to be equally matched to handle that production to whatever size the market requires (Helm *et al.*, 2004). Hatcheries prefer to sale spat at the smallest size possible because the economic implications of maintaining them in controlled conditions. Nevertheless, hatcheries should have the ability to handle different spat grades (sizes) at the same time to be able to better respond to the needs of each oyster farmer. In this sense, H2 and H4 showed the capacity to run more than four different spat grades at the same time. In contrast, H1 routinely operates with three different spat sizes, while H3 only handles one size making it the lowest rated hatchery.

2. Survival

A routine activity during nursing is check numbers of spat and survival for every grade. The percentage of spat that will survive is extremely variable and depend on density or biomass, offering a proper diet, and the presence of pathogens. In this stage may occur abnormal mortality events (Soletchnik *et al.*, 2007), that are usually sudden and severe causing elevated mortalities (up to 100%), and are mainly associated to OsHV-1 (Schikorski *et al.*, 2011). As observed in previous items, survival estimation is essential to calculate production units, feeding volumes, and detect possible concerns, but this become more important in the spat stage where organisms are closer to being put up for sale. In this aspect, the examined hatcheries do not pay much attention because it is an activity that H1, H3 and H4 do occasionally, and H2 never carries it out.

3. Management (sale)

A factor to be considered is the time spat remains in nursing conditions, which depends to a great extent on the size of spat preferred by oyster farmers to handle and cultivate. In tropical and subtropical regions oysters may develop gonads during nursing conditions due to a prolonged exposure to controlled temperatures and abundant food, which could have an effect on growth, susceptibility to pathogens and survival (Segarra *et al.*, 2010). The longer the spat stay in hatchery, the greater will be the stress when transferred to the sea for cultivation, affecting its biological performance and survival. However, the spat is more resistant to pathogens as increasing in size (Dégremont, 2013), so it is another factor to be considered.

Operators explained that they plan several spawning events during the production season and each one corresponds to a lot of spat for sale. Therefore, the first lot produced corresponds normally to the first spawning of the reproductive season. Generally, all the spat of this lot are not sold at the same time and some may remain weeks in nursing conditions until the last oysters are sold. Then, the second spat lot is produced and put-it up for sale, and then the third lot and so on (normally three or four lots per production cycle). According to testimonies of some oyster farmers about spat coming from the same spawning; the one that stays less in nursing conditions produce better performance than the one that lasts longer in controlled conditions. Similarly, they remark that spat quality diminishes as the production cycle progresses. These observations may relate to findings of a study in a Mexican commercial hatchery producing *C. gigas* (Pacheco-Carlón, 2016); they found that larval growth as well as metamorphosis success were significantly higher for the first spawning of the reproductive season and yields decrease as the reproductive cycle advanced. In this regard, hatcheries H3 and H4 reported that their spat lots are normally sold after the first week of nursing. In contrast, H1 and H2 use to keep lots of spat in nursing for several weeks before they are sold.

4. Genetics

Some contributions indicate that the main criterion to select broodstock should be its genetic variability since this is a fundamental aspect in the yield and survival of spat during cultivation (Yu and Li, 2007; Dégremont *et al.*, 2007; Samain *et al.*, 2007). It is known that broodstock are the individuals that will provide the genetic stock to the spat produced in hatcheries (Boudry *et al.*, 2002). However, several studies have shown reduction of genetic

variability in species used for aquaculture activities (Naish *et al.*, 2013; Fisch *et al.*, 2015), including *C. gigas* (Enríquez-Espinoza and Grijalva-Chon, 2010). In this case, the issue is attributed to the low number of broodstock used in hatcheries for reproduction and producing spat (Li *et al.*, 2006; Grijalva-Chon *et al.*, 2013). There is also the problem of using related oysters as broodstock, where the risk of relationship among them is high and increases the possibility of producing spat with signs of inbreeding (Doyle, 2016; Huo *et al.*, 2017). This practice is due in part to restrictions in the transfer of oyster lots among sites making that hatcheries use more frequently local specimens.

Analysis of the genetic variability of spat is crucial for oyster lines selection. If genetic variability is not considered in the selection of *C. gigas* broodstock in northwest Mexico, oyster culture will become unstable (Enríquez-Espinoza and Grijalva-Chon, 2010). However, these or similar analyses are not implemented in none of the examined hatcheries, so it becomes another critical point detected in the present study.

Microalgae culture

Unicellular marine microalgae, particularly flagellate and diatom species, constitute the main food source for larvae, juvenile, and adult bivalves in hatcheries. They are cultured in treated natural seawater enriched with nutrients, and its production is a critically important aspect for the successful functioning of any hatchery (Helm *et al.*, 2004).

1. Microalgae species (recommended by manuals of FAO and other scientific sources)

There are many microalgae species used for bivalve rearing reported in the scientific literature, for instance, Marshall *et al.* (2010) present the biochemical components and dry weights of 16 species. Similarly, Helm *et al.* (2004) prepared a list of the more commonly used species; within the flagellate species they included *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* (T-Iso), and *Pavlova lutherii*. It is important to note that *Isochrysis aff. galbana* clone Tahiti (T-Iso) is currently known as *Tisochrysis lutea* (Bendif *et al.*, 2013). In the diatoms they included *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema costatum*, and *Phaeodactylum tricornutum*. All the examined hatcheries maintain strains and cultivate a diversity of microalgae species and they use as food

most of the varieties mentioned above. Therefore, this is one of the points where all the hatcheries employ the best production alternative.

2. Production volumes

Hatcheries cultivate microalgae employing two alternatives; indoor using intensive culture with artificial illumination, or outdoor operating extensive culture in large tanks or ponds utilizing natural light. Whatever the cultivation option, hatcheries must calculate as accurate as possible the volumes that they require to properly feed the bivalves at any of the stages of development. A sub-production will not allow acceptable feeding while over-production will generate additional costs of materials, reagents, electricity, etc. In our survey we detected that all the hatcheries have an over-production of microalgae for all the phases of development. Although this somehow ensures an adequate volume of microalgae for feeding, improvements are needed to reduce the volumes and the costs associated.

3. Use as diets

Microalgae represent the vital food provision for broodstock conditioning, larvae development, and spat production. During conditioning, broodstock is constantly supplied with microalgae species rich in essential polyunsaturated fatty acids (PUFA); the type of diet will largely determine the quality of the gametes produced (Coutteau and Sorgeloos, 1992; Brown *et al.*, 1998). There are a variety of microalgae species used for conditioning bivalves (see Utting and Spencer, 1991; Helm *et al.*, 2004), but the most commonly used for *C. gigas* are *Chaetoceros calcitrans* and *Tisochrysis lutea* (Muller-Feuga, 2000; Da Costa *et al.*, 2017). For bivalve larval development is also necessary to offer a multi-specific microalgal diet (Rico-Villa *et al.*, 2006; Gonzalez-Araya *et al.*, 2012). An effective mixed-algal diet must be composed of two or three species with high nutritive values, often combining diatoms and flagellates (Robert and Gérard, 1999). Marshall *et al.* (2010) explain that nutrition can be the dominant factor influencing larval bivalve growth. These authors made a comprehensive review on the effects of nutrition on larval growth and survival of bivalves in hatcheries indicating that a mixture of the microalgal species *Tisochrysis lutea* and *Chaetoceros calcitrans*, has been the most successful for larval bivalve rearing. This combination normally shows good physiological performance and growth in Pacific oysters, apparently as it offers a good source of essential

polyunsaturated fatty acids (PUFA) as 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 (Dudognon *et al.* 2015). An important aspect during spat nursing is feeding; well-fed spat is fundamental for a good biological performance (Robert and Gerard, 1999), and its physiological condition determines the resistance to pathogens (Dégremont *et al.*, 2007). Similarly, fatty acid reserves provide resistance to a possible lack of food in the first phase of cultivation and help to tolerate stress of habitat change (Muller-Feuga, 2000).

Although some hatcheries in our study do not pay much attention to calculate the number of microalgae cells or to estimate the proportions for mixed diets, all the operators manifested that they know the importance of offering a multi-specific microalgal diet for broodstock, larvae and spat. So, all the hatcheries are offering bispecific and/or trispecific diets and because of this, this is one of the points in which are using the best alternative for feeding.

4. Diet preparation

The more common issues when offering a microalgae diet in any production stage are related to the use of poor quality algal cultures that may have become contaminated. During larval culture there is the problem of over-feeding or under-feeding larvae. In general, it is more detrimental to over-feed larvae since feeding rates are reduced and result in more food being added to the tank than can be filtered by the larvae (Helm *et al.*, 2014). For instance, Marshall *et al.* (2010) calculated the theoretical maximum effective doses of *C. calcitrans* and *T. lutea* for *C. gigas* larvae, suggesting 30,600 and 90,800 cells larva⁻¹ day⁻¹ respectively. While the ingestion rate of *C. calcitrans* is consistent with the upper value reported by Robert *et al.* (2001), the rate of *T. lutea* exceeds fourfold the highest value provided in literature (Rico-Villa *et al.*, 2006), and is beyond the upper limits of what can really be ingested by larvae (Marshall *et al.*, 2010).

Other aspect is that frequently, diets and rations are not formulated with a great degree of precision because little or no attention is paid to quantities (density of microalgae it is not counted) or proportions for combination of microalgae species. In this aspect, the minimum rate is for H2 which occasionally perform cell counting before feeding but never execute calculations of microalgae proportions for mixed diets. In the middle is H1, who sporadically calculate the cells but always estimate the quantities for the combined diets. The best rating was for H3 and H4 since they always count and determine the proportions for the diets.

Final notes

In first place, we noticed differences in the way hatcheries in Mexico perform their production processes and this undoubtedly affects the attributes of the spat produced by every one of them. Hatchery H4 was the best evaluated (average 3.6) and it is possible to consider that this has a good control on its procedures. Instead, hatcheries H1 and H3 rated lower because they had an average control in their operations (averages 2.7 and 3.2 respectively). In relation to H2, this obtained the lowest values (average 2.2) because in several processes they presented a below the average or poor control. Nevertheless, it can be concluded that in general, production of *C. gigas* spat in Mexico occurs under an average control of the production processes.

When a spat lot is sold, this can be sent to customers by diverse shipping ways (plane, bus, personal delivery, etc.), or the clients can collect the spat directly in the hatchery. In any case, the hatcheries guarantee that the spat is in perfect conditions to be seeded in a maximum period of 24 hours. Although operators make the proper recommendations for seeding, there are factors out of control or which corresponds to the oyster farmers handle. Among the factors mentioned by hatchery operators, it is possible to mention problems during transportation (high temperature, desiccation), mismanagement during arrival, seeding, or cultivation (first phases), inappropriate environmental conditions for seeding (too high or too low temperatures and/or salinities), mismatch with food availability, presence of persistent pathogens in the farms, etc. All these aspects may affect the subsequent performance of the spat in the field, but they cannot be attributed directly to the production processes of hatcheries.

Conclusions

The evaluation of oyster spat production in hatcheries is a highly complex issue given that involves multiple aspects that include biological, technical, and infrastructure factors, as well as the experience of the operators. As far as we have reference, this study is the first to compare and evaluate the production of *C. gigas* spat in different hatcheries by means of a protocol that considers all the phases involved in the process. Although the evaluation system employed here may be improved either by adding or eliminating points or changing the way of rating, this allowed us to identify a series of aspects from critical points, where there may be improvements, and what is functioning as the best production practices. Although each laboratory around the

world may have particular problems, the proposed evaluation protocol can be applied universally.

Any oyster hatchery can improve its production if, when applying this evaluation protocol, it detects processes with a low or intermediate rating. In the analyzed hatcheries under this protocol, we detect several critical points that, if addressed, can improve their competitiveness, and this would bring them benefits as better yields in the field and/or to be in possibilities of contending for sale their spat in international markets. Any improvement will have a positive impact on the oyster culture industry of the country.

Acknowledgments

We thank the staff of all the hatcheries that participated in this study (they prefer to remain anonymous), for allowing us to stay in their facilities, to record their activities, answer our questions, and show us their registers and notes. This study was funded by Fundación Produce Sonora (project 898-1) with additional support from CIBNOR (project 900-721). Reynaga-Franco, F., was a recipient of a fellowship from CONACYT Mexico.

References

- Asmani K, Petton B, Le Grand J, Mounier J, Robert R, Nicolas JL (2017) Determination of stocking density limits for *Crassostrea gigas* larvae reared in flow-through and recirculating aquaculture systems and interaction between larval density and biofilm formation. *Aquatic Living Resources* **30**: 29.
- Azéma P, Lamy JB, Boudry P, Renault T, Travers MA, Dégremont L (2017). Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution* **49**: 23.
- Bendif EM, Probert I, Schroeder, DC, de Vargas C (2013) On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology* **25**: 1763–1776.
- Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V, Bonhomme F (2002) High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* **204**: 283–296.

- Boulais M, Corporeau C, Huvet A, Bernard I, Quere C, Quillien V, *et al.* (2015) Assessment of oocyte and trochophore quality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **437**: 201–207.
- Brown MR, McCausland MA, Kowalski K (1998) The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* **165**: 281-293.
- Buroker NE (1983) Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* **23**: 271–279.
- Cáceres Martínez J, Vásquez Yeomans R (2014). Manual de buenas prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos. OIRSA-OSPESCA, San Salvador, El Salvador.
- Chávez-Villalba J, Barret J, Mingant C, Cochard JC, Le Pennec M (2002) Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: A new approach. *Aquaculture* **210**: 171-186.
- Chávez-Villalba J, Barret J, Mingant C, Cochard JC, Le Pennec M (2003) Influence of timing of broodstock collection on conditioning, oocyte production, and larval rearing of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) at six production sites in France. *Journal of Shellfish Research* **22**: 465-474.
- Chávez-Villalba J (2014) Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica* **24**: 175-190.
- Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, *et al.* (2012) Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics* **75**: 5554–5563.
- Correa F, Collins E, Ocegüera A, Cordero B, Domínguez D (2004) Allozymic variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from San Quintín Bay, Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas* **30**: 89-97.
- Coutteau P, Sorgeloos P (1992) The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research* **11**: 467-467.
- Da Costa F, Petton B, Mingant C, Bougaran G, Rouxel C, Quere C, *et al.* (2016) Influence of one selected *T isochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquaculture Nutrition* **22**: 813-836.

- Dégremont L, Ernande B, Bédier E, Boudry P (2007) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* **262**: 41-53.
- Dégremont L, Bédier E, Boudry P (2010) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* **299**: 21–29.
- Dégremont L (2013) Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **416-417**: 129-134.
- De-la-Re-Vega E, Sánchez-Paz A, Gallardo-Ybarra C, Lastra-Encinas MA, Castro-Longoria R, Grijalva-Chon JM, *et al.* (2017) The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish and Shellfish Immunology* **71**: 127-135.
- Diederich S, Nehls G, van Beusekom JEE, Reise K (2004) Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? *Helgoland Marine Research* **59**: 195.
- Diederich S (2005) Differential recruitment of introduced Pacific oysters and native mussels at the North Sea coast: coexistence possible? *Journal of Sea Research* **53**: 269–281.
- Doyle RW (2016) Inbreeding and disease in tropical shrimp aquaculture: a reappraisal and caution. *Aquaculture Research* **47**: 21-35.
- Dudognon T, Guderley H, Quere C, Soudant P, Racotta IS, Kraffe E (2015) Laboratory conditioning modifies properties of gills mitochondria from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* **162**: 1033–1045.
- Enríquez-Espinoza TL, Grijalva-Chon JM (2010) Genetic variability of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from a hatchery in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas* **36**: 333-344.
- Evans S, Langdon C (2006) Direct and indirect responses to selection on individual body weight in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **261**: 546–555.
- FAO (2008) El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA) Topics Fact Sheets. Text of Jean Francois Pulvenis. FAO, Rome [Cited 12 October 2018] Available from URL:<http://www.fao.org/fishery/sofia/es>

- FAO (2016) Species Fact Sheets, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973) In: Fisheries and Aquaculture Department. FAO, Rome [Cited 18 May 2018] Available from URL:<http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>.
- Fisch KM, Kozfkay CC, Ivy JA, Ryder OA, Waples RS (2015) Fish hatchery genetic management techniques: integrating theory with implementation. *North American Journal of Aquaculture* **77**: 343-357.
- Frias R, Segovia M (2010) Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: first step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of Shellfish Research* **29**: 303-308.
- Gallager SM, Mann R (1986) Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* **56**: 105–121.
- Gonzalez-Araya R, Mingant C, Petton B, Robert R (2012) Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. *Aquaculture* **364–365**: 272-280.
- Green TJ, Helbig K, Speck P, Raftos DA (2016) Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type infection. *Molecular Immunology* **78**: 113-120.
- Grijalva-Chon JM, Izaguirre-Castro O, Castro-Longoria R, López-Torres MA, Hoyos-Chairez F (2013) Variabilidad genética en ADN microsatélite de un nuevo linaje de ostión (*Crassostrea gigas*) en Sonora. *Biotecnia* **15**: 12-18.
- Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Enríquez-Espinoza TL, Maeda-Martínez AN, Mendoza-Cano F (2015) Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research* **43**: 776-780.
- Guo X, Ford SE, Zhang F (1999) Molluscan aquaculture in China. *Journal of Shellfish Research* **18**: 19-31.
- Guo X (2009) Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **1**: 251–259.
- Hay ME (2009) Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science* **1**: 193–212.

- Helm MM, Bourne N, Lovatelli A (2004) *Hatchery culture of bivalves—a practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper 471, FAO, Rome.
- Hoyos-Chairez FJ (2004) Ostricultura sonorensis; antecedente, presente y perspectiva de desarrollo sustentable. In: Zárata-Valdez JL (ed.) *Foro Intercambio de Experiencias en Agricultura y Desarrollo Rural Sustentables*, pp 2-11. Hermosillo, Mexico.
- Huo Z, Li N, Zhang X, Li Y, Yan X, Yang F (2017) Inbreeding depression on growth and survival of full-sib family of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Journal of Ocean University of China* **16**: 145-150.
- Ishikawa M (2012) *The pursuit of a sustainable coastal fishery: Comparisons of the oyster fishery in Chesapeake Bay and Ariake Sea*. University of Maryland, College Park, MD.
- Kube P, Cunningham M, Dominik S, Parkinson S, Henshall J, Finn B, et al. (2011) *Enhancement of the Pacific oyster selective breeding program*. CSIRO Marine and Atmospheric Research, Hobart, TAS 7001, Australia.
- Langdon C, Evans F, Jacobson D, Blouin M (2003) Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture* **220**: 227-244.
- Lango-Reynoso F, Chávez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M (2000) Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **190**: 183-199.
- Lango-Reynoso F, Chávez-Villalba J, Le Pennec M (2006) Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebrate Reproduction and Development* **49**: 41-50.
- Li Q, Yu H, Yu R (2006) Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* **259**: 95-102.
- Li Q, Wang Q, Liu S, Kong L (2011) Selection response and realized heritability for growth in three stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Science* **77**: 643-648.
- López JA, Maeda-Martínez AN, Monge A, Yen E (2008) Inducción al desove de la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* mediante algunas monoaminas y estrés mecánico. *Acta Pesquera* **1**: 60-73.
- Marshall R, McKinley RS, Pearce CM (2010) Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture* **2**: 33–55.

- Marshall R, Pearce CM, McKinley RS (2014) Interactive effects of stocking density and algal feed ration on growth, survival, and ingestion rate of larval geoduck clams. *North American Journal of Aquaculture* **76**: 265–274.
- Martínez-García MF, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Chávez-Villalba J, Enríquez-Espinoza TL, Maeda-Martínez AN, *et al.* (2017) OsHV-1 and notifiable protozoa in healthy *Crassostrea corteziensis* cultured in two distant areas of the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research* **45**: 699-707
- Miller PA, Elliott NG, Vaillancourt RE, Kube PD, Koutoulis A (2014) Genetic diversity and pedigree assignment in tetraploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **433**: 318-324.
- Miossec L, Le Deuff RM, Goulletquer P (2009). *Alien species alert: Crassostrea gigas (Pacific oyster)*. ICES Cooperative Research Report No. 299. Copenhagen, Denmark.
- Muller-Feuga A (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* **12**: 527-534.
- Naish KA, Seamons TR, Dauer MB, Hauser L, Quinn TP (2013) Relationship between effective population size, inbreeding and adult fitness-related traits in a steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) population released in the wild. *Molecular Ecology* **22**: 1295-1309.
- Nel A, Pitcher G, Richoux NB, Jackson S (2014) Culture environment and hatchery of origin influence growth, condition and feeding organ morphology in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in South Africa. *African Journal of Marine Science* **36**: 481-491.
- Pacheco-Carlón N (2016) *Protocolos innovadores de criterios de calidad larvaria de ostión japonés que permitan incrementar el rendimiento en cultivo y mejorar los sistemas de producción de semilla*. Msc Thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.C., La Paz, Mexico.
- Peeler EJ, Reese LA, Cheslett DL, Geoghegan F, Power A, Thrush MA (2012) Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine* **105**: 136-143.
- Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Degremont L, Lagarde F, *et al.* (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infection diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture Environment Interactions* **2**: 215-237.

- Renault T (2016) Malacoherpesviruses of Mollusks. In: Kibenge FSB, Godoy M (eds) *Aquaculture virology*, pp 513–524. Academic Press, Amsterdam.
- Reynaga-Franco FJ, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Barraza-Guardado RH, Arreola-Lizárraga JA, Chávez-Villalba J (2019) Biological performance of *Crassostrea gigas* stock produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions. *Aquaculture Research* **50**: 621-633.
- Richards GP, Watson MA, Needleman DS, Church KM, Häse CC (2015) Mortalities of Eastern and Pacific oyster larvae caused by the pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 292–297.
- Rico-Villa B, Le Coz JR, Mingant C, Robert R (2006) Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **256**: 377–388.
- Robert R, Gérard A (1999) Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* **12**: 121-130.
- Robert R, Parisi G, Rodolfi L, Poli BM, Tredici M (2001) Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* **192**: 333–346.
- Rodríguez-Jaramillo C, Ibarra AM, Soudant P, Palacios E (2017) Comparison of quantitative gonad maturation scales in a temperate oyster (*Crassostrea gigas*) and a sub-tropical oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Invertebrate Reproduction and Development* **61**:147-156.
- Samain JF, Degremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Delaporte M (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* **268**: 227-243.
- Sarkis S, Lovatelli A (2007) *Installation and operation of a modular bivalve hatchery*. FAO Fisheries Technical Paper 492. FAO, Rome.
- Sarkis S (2011). Hatchery design considerations: In: Lovatelli A, Sarkis A (eds) *A regional shellfish hatchery for the Wider Caribbean - Assessing its feasibility and sustainability*, pp 147-152, FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings 19, FAO, Rome.

- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin JF (2011) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by Ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research* **42**: 27.
- Segarra A, Pepin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortalities outbreaks of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* **153**: 92-99.
- Sokolowski A, Bawazir AS, Sokolowska E, Wolowicz M (2010) Seasonal variation in the reproductive activity, physiological condition and biochemical components of the brown mussel *Perna perna* from the coastal waters of Yemen (Gulf of Aden). *Aquatic Living Resources* **23**: 177-186.
- Soletchnik P, Ropert M, Mazurié J, Fleury PG, Le Coz F (2007) Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* **271**: 384-400.
- Song X, Wang H, Xina L, Xua J, Jiaac Z, Wang L, *et al.* (2016) The immunological capacity in the larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* **49**: 461-469.
- Spencer B (2008). *Molluscan Shellfish Farming*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Steinberg PD, de Nys R, Kjelleberg S (2002) Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 1935–1951.
- Uriarte I (2008) Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. In: Lovatelli A, Farías A, Uriarte I (eds) *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*, pp 61–75. FAO Actas de Pesca y Acuicultura 12, Puerto Montt, Chile.
- Utting SD, Spencer BE (1991) *The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research, Vol. 68, Lowestoft, UK.
- Vasquez HE, Hashimoto K, Yoshida A, Hara K, Imai CC, Kitamura H, *et al.* (2013) A glycoprotein in shells of conspecifics induces larval settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* **8**: e82358.
- Wang Q, Li Q, Kong L, Yu R (2012) Response to selection for fast growth in the second generation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Ocean University of China* **11**: 413–418.

- Wang J, Wu C, Xu C, Chao W, Zhuang Y, Yongchuan L, *et al.* (2015) Voltage-gated potassium ion channel may play a major role in the settlement of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Aquaculture* 442: 48-50.
- Wang T, Li Q, Zhang J, Yu R (2018) Effects of salinity, stocking density, and algal density on growth and survival of Iwagaki oyster *Crassostrea nippona* larvae. *Aquaculture International* **26**: 947-958.
- Yu H, Li Q (2007) Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assessed by microsatellite markers. *Journal of Genetics and Genomics* **34**: 1114-1122.

Table 1. Criteria to evaluate oyster spat production in hatcheries.

Production phase	Evaluated item	Criteria (scores)
General characteristics of the production system	Operational system	Operate under closed (5), semi-open (4-3), combine systems (3-2), or open (1) system.
	Automation level	Use automated (5), semi-manual (4-3), combined (3-2), or manual (1) procedures.
	Water quality	Continuously monitors temperature, salinity, oxygen, etc.; three or more times daily (5), twice daily (4), once daily (3), weekly (2), or occasionally (1).
		Conduct bacteriological tests in the production areas; weekly (5), monthly (4-3), yearly (2), or never (1).
	Sanitary (pathogens) certification before government agencies	Comply with mandatory analyzes; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Sanitary (pathogens) certification by private institutions	Perform complementary analyzes of pathogens; always (5), occasionally (3), or never (1).
Broodstock	Origin	Know or clearly identify the origin of each batch of breeding oysters for each production run; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Selection	Knowledge of the pedigree of the breeding oysters for each production run; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Stock of breeding oysters	They have more than 250 (5), 200 (4), 150 (3), 100 (2), or 50 (1) oysters of which to select for reproductive processes.
	Condition of breeding oysters	Breeding oysters average 120 mm (5), 100 mm (4), 80 mm (3), 60 mm (2), or < 60 mm (1) of shell length. Breeding oyster average 200 g (5), 150 g (4), 100 g (3), 75 g (2), or 60 g (1) of total weight.

	Time of conditioning	Perform conditioning during 8 weeks (5), 6 weeks (4), 4 weeks (3), 2 weeks (2), or do not conditioning (1).
	Evaluation of conditioning	Take samples to determine gonad development; always (5), occasionally (3), or never (1). Employ histological methods (5), stripping (4), visual observation (3-2), or no evaluate (1) gonad development.
Gamete production	Number of breeding oysters in each spawning event	They use more than 50 (5), 40 (4), 30 (3), 20 (2), or 10 (1) oysters for each production run.
	Spawning method	Selection between mechanical (5), physical (4), combine mechanical and physical (3-2), or chemical (1) methods.
	Number of spawning events for each breeding oyster	Participate just once (stripping or oyster returned to the sea) (5), or participate in 2 or more events (1).
	Crosses between different oyster lines	Identification and follow-up of each oyster line produced; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Gamete counting	Implement controls of gamete production during each run; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Fertilization and hatching rates	Perform calculations of these rates in each production run; always (5), occasionally (3), or never (1).
Larvae culture	Culture density	Use 10,000 (5), 15,000 (4), 20,000 (3), 25,000 (2), >30,000 larvae L ⁻¹ (1).
	Survival	Perform calculations of survival rates in each production run; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Settlement and metamorphosis	Carry-on determinations of settlement rates or after metamorphosis; always (5), occasionally (3), or never (1).

Culture of spat	Sizes	Manage 4 or more (5), 3 (4-3), 2 (2), or 1(1) size grades per production run.
	Survival	Perform calculations of survival rates in each production run; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Management (sale)	Sale of fresh new spat considering; 1 (5), 2 (4), 3 (3), 4 (2), or more weeks (1) of nursing.
	Genetics	Genetic variability is determined for each lot produced; always (5), occasionally (3), or never (1).
Microalgae culture	Microalgae species (recommended by manuals of FAO and other scientific sources).	They have strains and produce at least three of the following species: <i>Tisochrysis lutea</i> (formerly <i>Isochrysis aff. galbana</i> clone Tahiti T-Iso), <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>C. gracilis</i> , <i>Thalassiosira pseudomona</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Skeletonema costatum</i> ; always (5), occasionally (3), or never (1).
	Production volumes	Equilibrated production (5), over-production (3), under-production (1).
	Use as diets	Use trisppecific (5), bispecific (3), or monospecific (1) diets for broodstock, larvae and post-larvae.
	Diet preparation	Perform counting of microalgae cells before feeding; always (5), occasionally (3) or never (1). Execute calculations of microalgae proportions for mixed diets; always (5), occasionally (3) or never (1).

Table 2 Scores granted during the evaluation of the production of *Crassostrea gigas* oyster spat in Mexican hatcheries (1 – poor, 2 – below average, 3 – average, 4 – good, and 5 – best alternative).

Production phase	Evaluated item	Hatcheries			
		H1	H2	H3	H4
Characteristics of the production system	Operational system	2	2	5	3
	Automation level	2	2	5	3
	Water quality (monitoring)	4	4	5	4
	Water quality (bacteriological tests)	1	1	3	1
	Sanitary (pathogens) certification before government agencies	5	5	5	5
	Sanitary (pathogens) certification by private institutions	3	3	5	3
Broodstock	Origin	3	3	5	5
	Selection	1	1	5	3
	Stock of breeding oysters	4	1	1	5
	Condition of breeding oysters (shell length size)	4	2	2	4
	Condition of breeding oysters (total weight)	4	2	2	4
	Time of conditioning	3	3	4	3
	Evaluation of conditioning	3	3	3	5
Gamete production	Number of breeding oysters in each spawning event	1	1	1	1
	Spawning method	3	2	4	5
	Number of spawning events for each breeding oyster	3	1	1	5
	Crosses between different oyster lines	1	1	1	1
	Gamete counting	3	1	3	5
	Fertilization and hatching rates	1	1	1	1
Larvae culture	Culture density	3	3	3	5
	Survival	1	1	1	1
	Settlement and metamorphosis	1	1	1	1
Culture of spat	Sizes	3	5	1	5
	Survival	3	1	3	3
	Management (sale)	1	1	5	5

	Determine genetic variability	1	1	1	1
Microalgae culture	Microalgae species (recommended by manuals of FAO and other scientific sources).	5	5	5	5
	Production volumes	3	3	3	3
	Use as diets	5	5	5	5
	Cells counting	3	3	5	5
	Calculations proportions	5	1	5	5
Average rate of each hatchery		2.7	2.2	3.2	3.6

Artículo corto

**¿SON 45 AÑOS DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO SUFICIENTES PARA
IMPEDIR LA AMPLIFICACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES EN EL
OSTIÓN DEL PACÍFICO?
ARE 45 YEARS OF REPRODUCTIVE ISOLATION ENOUGH TO PREVENT THE
AMPLIFICATION OF MITOCHONDRIAL GENES IN THE PACIFIC
OYSTER?**

Sometido a *Aquatechnika*

Felipe Reynaga-Franco¹, José Manuel Grijalva-Chon¹, Jorge Eduardo Chávez-Villalba², Reina Castro-Longoria¹, José Alfredo Arreola-Lizárraga² and Ramón Héctor Barraza-Guardado¹

¹Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Guaymas, Sonora, México.

Corresponding author: José Manuel Grijalva-Chon. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Ave. Colosio s/n. Hermosillo, Sonora, México. CP 83000. (662)-259-2169. Email: manuel.grijalva@unison.mx

Título corto: ADNmt .de *Crassostrea gigas* mexicano

Running title: mtDNA in Mexican *Crassostrea gigas*

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, acuacultura, ostricultura, ADN mitocondrial, genética de poblaciones.

RESUMEN

El cultivo del ostión del Pacífico inició en México hace 45 años, primero con semilla importada de los EUA y ahora se utiliza semilla producida en varios laboratorios nacionales. Los ostricultores desconocen los parámetros que definen la calidad de la semilla que compran, entre ellos el nivel de la variabilidad genética disponible en los lotes ofertados. Con el fin de evaluar y comparar la variabilidad genética de la semilla de ostión producida por cuatro laboratorios mexicanos, se hizo un intento de amplificar y secuenciar la región no codificante mitocondrial, así como el gen ND5 mitocondrial con oligos reportados en la literatura científica. La amplificación de la región no codificante no fue posible debido al mal diseño de los oligos. A pesar de la integridad del extracto de ADN del ostión, el gen ND5 no fue posible amplificarlo debido posiblemente a la modificación del sitio de reconocimiento del oligo en dicho gen. La separación generacional del ostión cultivado en México con su fuente original hace necesario diseñar nuevos oligos adecuados a las poblaciones establecidas en México.

ABSTRACT

The Pacific oyster culture in Mexico began 45 years ago, first with spat imported from the USA and now with spat produced in several local hatcheries. Oyster farmers do not know the parameters that define the quality of the spat they buy, among them the level of genetic variability available in the lots offered. In order to evaluate and compare the genetic variability in spat produced by four Mexican hatcheries, an attempt was made to amplify and sequence the non-coding region and the ND5 gene of the oyster mitochondrial DNA with oligos reported in the scientific literature. The amplification of the non-coding region was not possible due to the bad design of the oligos. Despite the integrity of the extracted oyster DNA, the ND5 gene was not able to be amplified possibly due to the modification of the oligo recognition site in the gene. The generational separation of the oyster cultivated in Mexico from its original source population makes it necessary to obtain new mitochondrial sequences in order to design new oligos suitable for the populations established in Mexico.

Introducción

El ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, fue introducido en México hace aproximadamente 45 años con el propósito de diversificar la acuicultura y las actividades pesqueras en la costa del Pacífico del país (Islas-Olivares, 1975; De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991; Chávez-Villalba, 2014). Desde entonces ha sostenido a pequeños y medianos productores que atienden al mercado nacional, aunque están lejos de alcanzar el nivel de producción de la industria camaronícola de la misma costa mexicana. Esta actividad importó semilla de ostión desde los EUA en sus inicios, primero de organismos diploides y después de triploides, dependiendo de su disponibilidad. Actualmente, en el país existen varios laboratorios de producción de semilla, principalmente diploide, que atienden a los ostricultores. Esos laboratorios adquieren sus reproductores de las mismas granjas ostrícolas a quienes les venden la semilla, pero ocasionalmente obtienen reproductores de América del Sur o de Europa.

En especies de interés acuícola y que están sujetas a un ciclo de cultivo cerrado, con el control total de la reproducción y de la progenie, la variabilidad genética es un factor muy importante que contribuye a la calidad de la especie ofertada al acuicultor. Esta variabilidad puede reflejar los efectos de la selección artificial prolongada, la endogamia acumulativa, la divergencia de la fuente original y los cuellos de botella poblacional, ya que todo lo anterior conduce a una pérdida del potencial de adaptabilidad de las poblaciones (Barg, 1992). Los estudios sobre la estructura y variabilidad genética poblacional en el ostión del Pacífico se han llevado a cabo con alozimas, microsatélites, AFLP, y secuencias de ADN mitocondrial en poblaciones naturales ((Ozaki y Fujio, 1985; Yang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008), ferales (Li *et al.*, 2003; Meistertzheim *et al.*, 2013) y cultivadas (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991; Launey y Hedgecock, 2001, Li *et al.*, 2006; Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon, 2010).

En el estudio de la variabilidad mitocondrial, la región no codificante se ha usado ampliamente para el análisis del polimorfismo y la variabilidad poblacional (Ferris y Berg, 1987; Allendorf *et al.*, 2013). Sin embargo, recientemente el gen mitocondrial NADH deshidrogenasa 5 (ND5) se ha utilizado exitosamente para el análisis de estructura genética poblacional (Makhawi *et al.*, 2013), incluyendo al ostión del Pacífico (Kawamura *et al.*, 2017). En el caso de *C. gigas* cultivado en México, se ha estudiado poco, con excepción de algunas investigaciones con alozimas (De la Rosa-Velez *et al.*, 1991; Correa *et al.*, 2004; Enríquez-

Espinoza *et al.*, 2010), y microsatélites (Cruz *et al.*, 2007; Grijalva-Chon *et al.*, 2013). Con el fin de comparar las diferencias en la variabilidad genética de la semilla de ostión disponible en el noroeste de México, se pretendió llevar a cabo un estudio genético poblacional considerando al semilla producida por cuatro grandes laboratorios de producción de la región.

Materiales y métodos

En mayo del 2014 se recibieron cuatro lotes de 10,000 semillas de cuatro de los principales laboratorios de producción del noroeste de México. Las semillas fueron cultivadas en módulos Nestier distribuidos en línea madre en la laguna costera La Cruz, Sonora, México (Golfo de California, 28° 47' 34" N, 111° 53' 27" W, ver Reynaga-Franco *et al.* (2019) para los detalles de los laboratorios y sus ubicaciones geográficas). Después de tres meses de cultivo, se tomaron 50 organismos por lote, la concha fue removida y el tejido blando fue preservado en tubos de 1.5 ml con etanol absoluto (>95%) y transportados al Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad de Sonora para ser procesados. Subsecuentemente, se tomó una porción de 20-25 mg del tejido preservado y se realizó la extracción del ADN con el juego de reactivos QIAamp DNA Mini Kit, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (QIAGEN). La concentración (ng/μl) y la pureza (A_{260}/A_{280}) se estimaron con un espectrofotómetro Nanodrop 1000.

Para corroborar la integridad de los extractos de ADN, así como la ausencia de factores inhibidores, se llevó a cabo una amplificación por PCR con los oligos universales CAS1S: 5'-GGAATTGACGGAAGGGCACCC-3' y CAS2: 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAAGG-3', reportados por Le Roux *et al.* (1999). Estos oligos amplifican una sección de 521 pb del gen nuclear 18S rDNA de un gran número de especies de eucariotas, incluyendo a los moluscos. Para evaluar la variabilidad genética de *C. gigas*, se seleccionaron la región no codificante mitocondrial y el gen mitocondrial NADH subunidad 5 (ND5). Para obtener un amplicón esperado de 739 pb de la región no codificante se utilizaron los oligos 5'-TCACAAGTACATTTGTCTTCCA-3' y 5'-AACGTTGTAAGCGTCATGTAAT-3' reportados por Aranishi y Okimoto (2005). Para el gen ND5, se utilizaron los oligos CgND5.6 F5: 5'-TAGCCCTACAGTTTCATTATCG-3' y CgND5.6 R5: 5'-AAATACTTACAGGAAAAGCGA-3', reportados por Kawamura *et al.* (2017) y que amplifican un fragmento de 524 pb. Todas las reacciones de ADN se llevaron a cabo con las

mezclas liofilizadas PuRe Taq Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare) siguiendo las proporciones y condiciones de PCR recomendados por los autores mencionados arriba. Adicionalmente, llevamos a cabo algunas pruebas para modificar las condiciones reportadas por los autores de los oligos utilizados en este estudio. Primero, modificamos los tiempos de los ciclos térmicos para la desnaturalización, alineación y extensión reportados por Arinichi y Okimoto (2005), ya que ellos reportaron unos pocos segundos para cada paso y nosotros los incrementamos a 60 segundos. En el caso de los oligos para la región no codificante y el gen ND5, llevamos a cabo pruebas de gradiente para la temperatura de alineación (de 51 a 61 °C para los oligos de la región no codificante, y de 50 a 59 °C para los oligos de ND5) y para concentración de MgCl₂ (de 1.5 a 5.0 mM). Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo en un termociclador BioRad DNA Engine, y además en una réplica de 10 organismos por lote en un termociclador Techne TC-412. Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 2% a 15 V/cm por 40 minutos para observar los resultados de las amplificaciones.

Resultados y discusión

El promedio del cociente A_{260}/A_{280} fue de 2.07 ± 0.2 , considerando las 200 muestras, lo que indica un aceptable valor de pureza. Sin embargo, no fue posible obtener amplicones de las dos regiones mitocondriales en ninguna de ellas, ni con las condiciones originales reportados por los autores, ni con el cambio de los parámetros de los ciclos termales, ni cambiando de termociclador. Sin embargo, debido a que los oligos universales corroboraron la ausencia de factores inhibidores, la integridad y buena calidad de los extractos de ADN (Fig. 1), se llevó a cabo un análisis de la calidad del diseño de los oligos utilizando la plataforma informática Multiple Primer Analyzer disponible en www.thermofisher.com. Este análisis demostró que los oligos para ND5 están bien diseñados, pero los reportados por Arinichi y Okimoto (2005) forman dímeros (Fig. 2) que los hacen inútiles para la amplificación de ADN de ostión.

El uso de oligos reportados en la literatura científica ahorra tiempo, dinero y esfuerzo ya que representan el esfuerzo validado de un grupo de investigación. Sin embargo, existen caso del uso extendido de oligos y en donde años después se demuestra que dan como resultado una alta frecuencia de falsos negativos (Lynch *et al.*, 2013). Sorprendentemente, considerando el tiempo transcurrido, no encontramos literatura científica que reportaran el uso de los olitos de

Arinichi y Okimoto (2005), ni otros estudios que reportaran haber fallado en replicar los resultados de esos autores. Considerando que los oligos universales dan resultados favorables, y que hay un mal diseño en los oligos reportados por Arinichi y Okimoto (2005), se puede considerar que la causa de la amplificación negativa de ND5 es la variación de las secuencias diana en los ostiones. Si consideramos que el ADN mitocondrial tiene una alta tasa evolutiva, de 5 - 10 veces más rápida que el ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979), y el tiempo transcurrido y el aislamiento de las poblaciones de los ostiones cultivados en México con su población fuente silvestre en Japón, puede haber ahora un grado de diferenciación genética que evite la amplificación por PCR con los oligonucleótidos reportados por Kawamura *et al.* (2017) debido a mutaciones puntuales acumuladas en la secuencia de reconocimiento del ostión. Sin embargo, para tener una idea de la magnitud de la divergencia entre los ostiones aislados y cultivados en el continente Americano y las poblaciones naturales del Pacífico oeste, es necesario buscar un adecuado marcador mitocondrial, lo cual sería interesante abordar al corto plazo.

El uso de microsátélites es una buena alternativa para el estudio de la estructura genética poblacional en *C. gigas* (Magoulas *et al.*, 1998; Huvet *et al.*, 2000; McGoldbrick *et al.*, 2000; Launey y Hedgecock, 2001; Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Grijalva-Chon *et al.*, 2013), pero el análisis de secuencias de genes mitocondriales es una metodología más económica y que requiere menos tiempo en el laboratorio y en el análisis de datos. Por esta razón, es necesario diseñar nuevos oligos para el análisis genético del ostión del Pacífico cultivado en el continente Americano y en particular en México. Sin embargo, aunque existe información de mitogenomas de *Crassostrea* (Yu y Li, 2012), no hay información sobre secuencias moleculares de organismos cultivados en América para que nuevos oligos se puedan diseñar a partir de ellos. Esto es una necesidad que debe de ser abordada y resuelta en el corto plazo.

El análisis de la variabilidad genética de la semilla de ostión producida en el noroeste de México es uno de los elementos necesarios para evaluar la calidad de la semilla ofertada, ya que una parte fundamental de sus atributos viene de los progenitores, los cuales son seleccionados por sus atributos físicos y no por sus atributos genéticos. Como una medida de la diversificación de la variabilidad genética, algunos laboratorios intercambian reproductores, ocasionalmente con importaciones del exterior (Grijalva-Chon *et al.*, 2013), pero nadie ha importado organismos de Japón o de sus aguas adyacentes.

Desde la perspectiva de los propietarios de los laboratorios no es muy redituable pagar los costos de un monitoreo genético para cada lote producido, ni siquiera una vez al año. Si esto se hiciera, se pudieran realizar los ajustes necesarios para mantener una variabilidad genética estable y se podría obtener una semilla con una mejor resistencia a los patógenos, mejores tasas de crecimiento y mejor desempeño biológico en general (Dégremont *et al.*, 2007). Además, para reforzar la calidad de la semilla, se tiene que implementar un estricto seguimiento del pedigrí para mantener un nivel aceptable de heterocigosis y un mínimo de endogamia. La relevancia de la variabilidad genética en la semilla de ostión es innegable, por lo que establecer un criterio para evaluarla e incluirlo en los protocolos de producción es uno de los principales retos en este campo para los laboratorios de producción en el mundo.

Conclusiones

En acuicultura, el estimar la variabilidad genética en los linajes seleccionados por los laboratorios de producción proporciona información que puede ser relacionada con el desempeño biológico de los organismos cultivados. De esta forma, un linaje con un buen nivel de variabilidad genética seguramente generará buenos niveles de producción al momento de la cosecha. En el caso de los linajes de ostión del Pacífico estudiados aquí, se desconoce el nivel de variabilidad genética asociada a ellos. La tasa mutacional del genoma mitocondrial es mucho más elevada que la del genoma nuclear, y considerando que el ostión del Pacífico cultivado en México tiene más de 40 años de aislamiento de su población nativa, es necesario obtener la secuencia de la región no codificante mitocondrial de los linajes mexicanos para diseñar nuevos oligos que permitan utilizar esta sección del genoma para estimar la variabilidad genética.

Agradecimientos

Agradecemos a Andrés Hernández-Ibarra y Josué Valenzuela-Díaz (CIBNOR), Martín Rodrigo Acedo-Valdez (Universidad de Sonora) y Víctor Vera-López (CREMES) por su ayuda técnica de campo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue realizado con el financiamiento de Fundación Produce Sonora (proyecto 898-1). El primer autor recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

References

- Allendorf, F.W., Luikart, G. and Aitken, S.N. (2013). Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell. Chichester, UK.
- Arinichi, F. and Okimoto, T. (2005). Sequence polymorphism in a novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. *Journal of Applied Genetics* 46: 201-206. <https://pdfs.semanticscholar.org/0f50/616cbd1a9239c33c305c489021d5d4f579be.pdf>
- Barg, U.C. (1992). Guidelines for the promotion of environmental management of coastal aquaculture development. FAO Fisheries Technical Paper. No. 328. FAO. Rome. 122 p. <http://www.nativefishlab.net/library/textpdf/15577.pdf>
- Brown, W.M., George Jr., M. and Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 76: 1967-1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica* 24: 175-190. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/577/168>
- Correa, F., Collinsm, E., Ocegüera, A., Cordero, B. and Domínguez, D. (2004). Allozymic variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from San Quintín Bay, Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas* 30: 89-97. <http://www.cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarinas/article/view/118/97>
- Cruz, P., Yáñez-Jacome, B., Ibarra, A.M. and Rangel-Becerril, J. (2007). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. *Molecular Ecology Notes* 7: 448-450. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01613.x>

- De la Rosa-Vélez, J., Gutiérrez-Wing, M.T. and Radilla-Camacho, R. (1991). El ostricultivo de Bahía de San Quintín, B.C. México; Aspectos genéticos. *Ciencias Marinas* 17: 133-147. <http://www.cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarinas/article/view/812/737>
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E. and Boudry, P. (2007). Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262: 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.025>
- Enríquez-Espinoza, T.L. and Grijalva-Chon, J.M. (2010). Genetic variability of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from a hatchery in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas* 36: 333-344. <http://www.cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarinas/article/view/1609/1743>
- Ferris, S.D. and Berg, W.J. (1987). The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. En: *Population Genetics and Fishery Management*. N. Ryman y F. Utter (eds.), pp. 277-299. University of Washington Press. Seattle, USA.
- Grijalva-Chon, J.M., Izaguirre-Castro, O., Castro-Longoria, R., López-Torres, M.A. and Hoyos-Chairez, F. (2013). Variabilidad genética en ADN microsatélite de un nuevo linaje de ostión (*Crassostrea gigas*) en Sonora. *Biotecnia* 15(1): 12-18. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/130/123>
- Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C. and Bonhomme, F. (2000). Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics* 31: 71-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2000.579-5.x>
- Islas-Olivares, R. (1975). El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. *Ciencias Marinas* 2: 58-59. <http://www.cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarinas/article/view/270/229>
- Kawamura, K., Miyake, T., Obata, M., Aoki, H. and Komaru, A. (2017). Population demography and genetic characteristics of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Japan. *Biochemical Systematics and Ecology* 70: 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.12.006>

- Launey, S. and Hedgecock, D. (2001). High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 159: 255–265. <http://www.genetics.org/content/159/1/255>
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A. and Berthe, F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1: 588–597. <https://doi.org/10.1007/PL00011814>
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. and Hedgecock, D. (2003). Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes* 3: 228–232. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00406.x>
- Li, Q., Yu, H. and Yu, R. (2006). Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* 259: 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.030>
- Lynch, S.A., Dillane, E., Carlsson, J. and Culloty, A. (2013). Development and assessment of a sensitive and cost-effective polymerase chain reaction to detect ostreid herpesvirus 1 and variants. *Journal of Shellfish Research* 32: 657–664. <https://doi.org/10.2983/035.032.0305>
- Magoulas, A., Gjetvag, B., Terzoglou, V. and Zouros, E. (1998). Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics* 29: 69–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1998.00221.x>
- Makhawi, A.M., Liu, X.B., Yang, S.R. and Liu, Q.Y. (2013). Genetic variations of ND5 gene of mtDNA in populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) malaria vector in China. *Parasites and Vectors* 6: 290. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-290>
- McGoldbrick, D.J., Hedgecock, D., English, L., Baoprasertkul, P. and Ward, R.D. (2000). The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research* 19: 779–788. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[985:AOTPPA\]](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[985:AOTPPA])
- Meistertzheim, A.L., Arnaud-Haond, S., Boudry, P. and Thébault, M.T. (2013). Genetic structure of wild European populations of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* due to aquaculture practices. *Marine Biology* 160: 453–463. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-012-2102-7>

- Ozaki, H. and Fujio, Y. (1985). Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku Journal of Agriculture Research* 36: 49-61. <http://hdl.handle.net/10097/00099758>
- Yang, R., Yu, Z., Chen, Z., Kong, X. and Dai, J. (2000). Allozyme variation within *Crassostrea plicatula* and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters. *Journal of Fisheries of China* 24: 130-133. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000110849>
- Yu, H. and Li, Q. (2012). Complete mitochondrial DNA sequence of *Crassostrea nippona*: comparative and phylogenomic studies on seven commercial *Crassostrea* species. *Molecular Biology Reports* 39: 999-1009. <http://doi.org/10.1007/s11033-011-0825-z>
- Yu, H., Li, Q. and Yu, R. (2008). Genetic differentiation between Zhe oyster *Crassostrea plicatula* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations in China assessed by microsatellite analysis. *Fisheries Science* 74: 88–97. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01499.x>

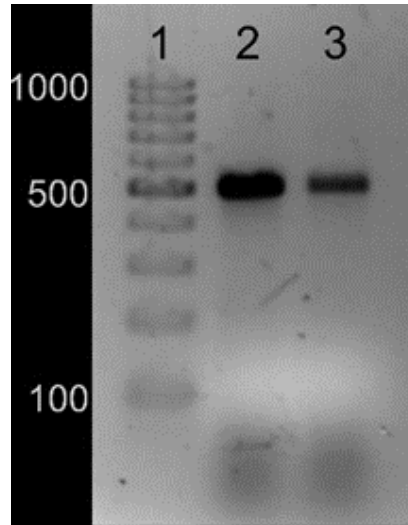


Figura 1. Amplificación por PCR con los oligos CAS1S/CAS2. Línea 1: escalera de 100 pb. Línea 2-3: amplicón de 521 pb en dos muestras de *Crassostrea gigas*.



Figure 2. Formación de dímeros con los oligos reportados por Arinichi y Okimoto (2005) para amplificar la región no codificante mitocondrial de *Crassostrea gigas*.

Biological performance of *Crassostrea gigas* stocks produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions

Felipe-de-Jesús Reynaga-Franco¹ | José-Manuel Grijalva-Chon¹  |

Reina Castro-Longoria¹ | Ramón-Héctor Barraza-Guardado¹ |

José-Alfredo Arreola-Lizárraga² | Jorge Chávez-Villalba² 

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Mexico

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Sonora, Guaymas, Mexico

Correspondence

Jorge Chávez-Villalba, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Sonora, Sonora, Mexico.
Email: jechavez04@cibnor.mx

Funding information

Fundación Produce - Sonora, Grant/Award Number: 898-1; CONACYT

Abstract

Production protocols as well as the origin of broodstock in hatcheries are the important factors determining the attributes of *Crassostrea gigas* oyster spat. Spat from diverse hatcheries may have different attributes for commercial activities. We described the biological performance (growth and condition index – CI) of spat stocks produced at different hatcheries (H1, H2, H3 and H4), and simultaneously cultivated in La Cruz lagoon (Mexico). Analysis of pathogens and genetic variability was performed for each stock. Temperature, salinity, chlorophyll *a* and seston were measured during samplings. Stocks showed similar growth patterns but each one showed a distinctive curve. Temperature was the governing factor on growth but its effect was variable depending on the stock and whether the temperature increases, stays high or decreases. Availability of food was high producing elevated CI. No presence of pathogens was detected and it was not possible to obtain amplicons of the mitochondrial regions. Despite differences in performance among stocks, all of them showed higher values (growth rates, CI, survival) than the standards reported for the Gulf of California. These findings are useful for the production and cultivation of *C. gigas*, but more studies are needed to understand the influence of hatchery protocols on spat quality.

KEYWORDS

condition index, genetic variability, growth, pathogens, spat, temperature

1 | INTRODUCTION

The Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) is the most cultivated bivalve in the world with an aquaculture production of 625,925 tons in 2014 (FAO, 2017). The species is currently cultivated in almost all the seas of the world because of its great adaptability to different environmental conditions and its rapid growth (Diederich, Nehls, Beusekom, & Reise, 2005; Miossec, Le Deuff, & Gouletquer, 2009). The spat or postlarva is the prime material for cultivation activities and normally is obtained from the natural

environment using collectors placed in strategic places during the spawning season (Robert & Gérard, 1999). Nevertheless, spat collection is affected by diverse factors as extreme environmental conditions, pollution, low yields or absence of natural collection in some regions (Mai et al., 2013; Neto et al., 2013). In these cases, oyster farmers obtain the spat from certified hatcheries, which replicate the reproductive cycle of the species under controlled conditions (Chávez -Villalba, 2014). This strategy allows producing spat almost in any time of the year, as well as obtaining spat free of pathogens,

triploid organisms, among other benefits (Akashige & Kusuki, 1996). These advantages have positioned hatcheries as fundamental elements to support the aquaculture industry of *C. gigas* worldwide. For instance, China is the main world producer of Japanese oysters performing almost all its cultivation activities using hatchery produced-spat (Guo, Ford, & Zhang, 1999).

The hatchery-spat of most cultivated bivalve species is produced using essentially the same methods and these are adapted to new species without any great changes (Helm, Bourne, & Lovatelli, 2004). In general, there are four production phases in any hatchery including 1- broodstock conditioning, spawning and fertilization, 2- culture of larvae (feeding, settlement and metamorphosis), 3- culture of spat (nursing, remote setting), 4- culture of algae (as supply of food in form of microalgae). These phases are meticulously described in manuals or guides for the rearing of bivalve species (Helm et al., 2004; Spencer, 2008; Utting & Helm, 1985). Despite this knowledge and years of practice, reproductive success and profitability of hatcheries remain inconsistent (Corporeau et al., 2012).

The variation of success in hatcheries is associated to difficulties that normally confront operators during each phase of spat production. Although many issues are not reported in literature, the most relevant concerns have been described in various studies. Some examples are; (a) the reduction of genetic variability in oysters due to the low number of broodstock used in hatcheries for reproduction and producing spat (Dégremont, Lamy, Pépin, Travers, & Renault, 2015; Grijalva-Chon, Izaguirre-Castro, Castro-Longoria, López-Torres, & Hoyos-Chairez, 2013), (b) great variability in the quality of the gametes, mainly related to the type of diet and rations of microalgae used during conditioning (Chávez-Villalba et al., 2002; Soudant et al., 1999; Utting & Spencer, 1991), (c) low growth rates during larval culture correlated to the use of poor quality algal cultures, as well as overfeeding or underfeeding larvae (Helm et al., 2004), (d) high mortalities during larval culture associated to the presence of bacteria (*Vibrio tubiashii*, *Vibrio corallilyticus*), viruses as Ostreid herpesvirus type 1 (OsHv-1) and other pathogens (Burge et al., 2007; Friedman et al., 2005; Petton, Boudry, Alunno-Bruscia, & Pernet, 2015; Solomieu, Renault, & Travers, 2015), (e) changes in the seawater supply, such low pH and high CO₂ conditions (Barton et al., 2015). Although there is abundant information about microalgae species used in hatcheries and their nutrimental characteristics (Da Costa et al., 2016; Ponis et al., 2008; Volkman, Jeffrey, Nichols, Rogers, & Garland, 1989), there are difficulties in maintaining healthy microalgae cultures and there are often inconsistencies in the formulation of diets and rations for broodstock and larvae (Helm et al., 2004; Hoyos-Chairez, 2004). It is highly probable that previous factors, either acting alone or combined, have an effect on gametes and larvae producing a great variation of spat attributes.

Generally, there are no reports about the problems encountered after seeding the spat in the field, most studies report performance of organisms after having completed the cultivation cycle and reaching commercial size. Nevertheless, Uriarte (2008) indicated that bivalve spat produced in hatcheries (Chile), may present high mortalities, low physiological condition and slow growth rates during early

stages. Some oyster farmers in Mexico confirm previous problems with *C. gigas* spat from hatcheries, and add as a current concern the oysters that do not grow and stay small (dwarfism) (F. Hoyos-Chairez, personal communication, January, 2018; Hoyos-Chairez, 2004). These problems could be the confirmation that the complications faced during hatchery production affect spat performance (attributes), highlighting the influence of protocols on this issue. If it is also considered that hatchery operators adjust information from guides and manuals to their technical capacity, infrastructure and particular environmental conditions, then the number of variations in the protocols multiplies. Therefore, it is possible to ask, how much influence do these variations have on the biological performance of the spat during cultivation?

In order to address this issue for the first time and try to postulate initial answers, we conducted a study to compare the biological performance of *C. gigas* spat stocks produced at different hatcheries and cultivated under identical conditions in the field. In particular, we focused on: (a) define the genetic variability of each spat stock, (b) describe and compare growth and physiological condition during cultivation, (c) determine the presence of pathogens on spat and adult oysters and (d) describe the variation of the environmental variables and their possible influence on growth and condition. Findings are discussed to formulate some conclusions, while drawbacks are described as important factors limiting the scope of the study as well as to identify potential areas for future research.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Stocks of *Crassostrea gigas*

There are around 10 commercial hatcheries that produce spat of *C. gigas* in northwestern Mexico; these operate independently and employ oysters (broodstock) from diverse sources. For this study we just could contact seven but only four agreed to participate in our study being named H1, H2, H3 and H4 for identification purposes (Figure 1). As a baseline information, the broodstock used by H1, H2 and H4 was originally imported from the United States, and from these oysters each hatchery established their reproductive lines. These organisms are normally cultivated in farms of each locality and selected from here for the reproductive processes. In the case of H3, broodstock come from a family-based selective breeding program, but due to intellectual property issues no more information was accessible. During the production cycle of 2014, we bought a stock of 10,000 spat from each hatchery based on availability and asking that lots were delivered in a specific date to initiate the experiments in identical conditions. However, H2 and H4 could not have the spat stocks on the agreed date and these were delivered 6 days later. The stocks were received in the city of Hermosillo (Mexico) and then transported to the laboratory of the Kino-Unit of the Universidad de Sonora for a general inspection before starting the experiments. Samples of organisms were taken randomly from each stock to determine the average shell height with an electronic caliper and the average weight with a precision balance. Then the stocks

were placed in cultivation to describe their performance in the field; cultivation was performed from May 9 to December 10, 2014. Juveniles and adults from each stock were taken at random for the analysis of pathogens; before starting the experiments and at the end of cultivation period, respectively. Samples of organisms were taken during the third month of cultivation for analyses of genetic variability.

2.2 | Performance of oysters during cultivation

The spat stocks were cultivated using the traditional system and standard protocols (cleaning and maintenance) for oyster cultivation in the region. The cultivation started placing the spat of every hatchery inside 2 mm mesh-bags at an approximate density of 1,250 oyster per bag, then the bags were placed in Nestier plastic trays. The trays with bags were positioned in such a way that modules of five trays were formed; four containing oysters and one with a polystyrene float. Every hatchery produced two replicated modules and each one was marked with a plastic band of different colour to identify the oysters of each hatchery. All the modules were tied to longline systems located at La Cruz lagoon (Sonora, Mexico; 28°47'58.00200" N: 111°54'55.54080" W) (Figure 1). Cultivation density was reduced gradually every month (10%–15%), and oysters were placed directly on trays when they reached a shell size >15 mm. The maintenance consisted of placing clean trays, rinsing the oysters with seawater, getting rid of predators and recovering the empty shells and moribund oysters to estimate mortality.

Samplings to determine the individual growth of oysters were performed every 2 weeks from May to August and monthly from September to December 2014. In every occasion, a sample of 50 oysters from each replicate of every stock was taken to the laboratory to be brushed and rinsed with tap water (eliminate mud and remove fouling). Then they were dried with blotting paper and

individually measured with an electronic caliper (shell height and length), finally, the total weight of each oyster was obtained with a precision balance. Daily growth rates of the shell were estimated according to Chávez-Villalba, Hernández-Ibarra, López-Tapia, and Mazón-Suástegui (2008) using the equation $DWR = t1 - t0/D$; where DWR = daily growth rate, $t1$ = final size of oysters for a specific period, $t0$ = initial size of oysters for a specific period, and D = number of cultivation days. Similarly, the daily weight increase was estimated using the equation $DWI = w1 - w0/D$; where DWI = daily weight increase, $w1$ = final weight of oysters for a specific period, $w0$ = initial weight of oysters for a specific period, and D = number of cultivation days.

After measurements, condition index (CI) for juveniles <20 mm shell length was determined based on Barraza-Guardado, Chávez-Villalba, Atilano-Silva, and Hoyos-Chairez (2009), who developed an equation for this size of oysters; $CI = (OM/TDW) \times 100$, where CI = condition index, OM = organic matter and TDW = dry tissue weight. For oysters >20 mm, we used the equation proposed by Walne and Mann (1975), which has been used for juveniles and adults of *C. gigas* in various studies (Chávez-Villalba et al., 2008, 2002). Accordingly, the organisms were opened and tissues removed to be dried in an oven for 48 hr at 70°C to determine dry weight. Then CI was estimated using the equation $CI = P1 \times 1000/P2$; where CI = condition index, $P1$ = tissue dry weight and $P2$ = shell dry weight. Condition index of H4 was not determined at the beginning of the study due to technical issues. Empty shells and moribund organisms were taken and counted in every sampling to determine mortality.

2.3 | Analysis of pathogens

As indicated previously, for the analysis of pathogens 100 juvenile oysters were taken from each stock before seeding, while 30 adult

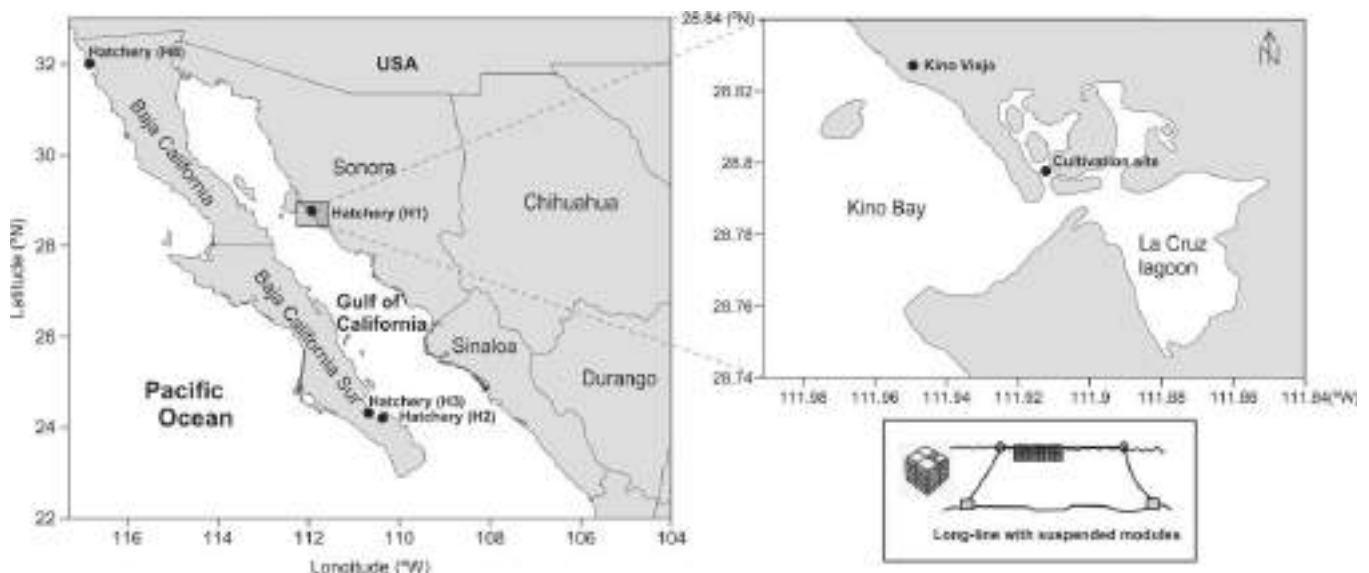


FIGURE 1 Location of hatcheries producing *Crassostrea gigas* spat selected for the study and site of experimental cultivation. The culture system used for the experiments is shown

oysters were taken from each stock at the end of cultivation period. All samples were preserved in ethanol ($\geq 95\%$). In the case of juveniles, these were pooled into lots of five organisms (shell included) to obtain a total of 20 lots. The procedures were the same for juveniles and adults; DNA extractions were carried out with the QIAamp DNA Mini Kit reagent set according to the manufacturer's instructions (QIAGEN). The concentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$) and purity (A_{260}/A_{280}) was estimated with a Nanodrop 1,000 spectrophotometer. PCR analyzes were performed for the detection of ostreid herpes virus (OsHV-1), *Perkinsus marinus* and *Marteilia refringens* with oligonucleotides already reported in the scientific literature. For OsHV-1 we used oligos C2: 5'-TCTTTACCATGAAGATACCCACC-3' and C6: 5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3' reported by Arzul et al. (2014), while the amplification conditions were those described by Renault, Le Deuff, Chollet, Cochenec, and Gérard (2000) and Vigneron, Sollicie, Montanié, and Renault (2004). For *Perkinsus marinus* we used the oligos PerKITs-85: 5'-CCGCTTTGTTGGATCCC-3' and PmarITS-600R: 5'-GAGTTTGCAGTACCTCKAGAG-3' reported by Casas, La Peyre, Reece, Azevedo, and Villalba, (2002) and Audemard, Reece, and Burreson (2004), with the amplification conditions informed by Enriquez-Espinoza, Grijalva-Chon, Castro-Longoria, and Ramos-Paredes (2010). Finally, for *Marteilia refringens* a nested PCR was performed with oligos MT-1: 5'-GCCAAAGACACGCCTCTAC-3' and MT-2: 5'-AGCCTTGATCACACGCTTT-3' reported by López-Flores et al. (2004). Of this PCR reaction, 1 μl was taken to carry out a nested reaction with the MT-1B primers: 5'-CGCCACTACGACCGTAGCCT-3' and MT-2B: 5'-CGATCGAGTAAGTGCATGCA-3' under the same conditions of amplification of the MT-1/MT-2 primers. A negative blank without DNA and positive targets for each of the pathogens analyzed were included in all PCR runs. Positive targets consisted of DNA extracts from oysters infected with these pathogens. All PCR products were visualized on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

2.4 | Genetic variability in mitochondrial DNA

Samples of 50 oysters were taken per hatchery at the third month of the experimental cultivation to determine the genetic variability of each stock. The organisms were transported to laboratory, and soft tissue extraction was performed with the QIAamp DNA Mini Kit according to the manufacturer's specifications (QIAGEN). The concentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$) and purity (A_{260}/A_{280}) was estimated with a Nanodrop 1,000 spectrophotometer. To amplify the mitochondrial DNA non-coding region by PCR, the oligos CgCRF were used: 5'-TCA-CAAGTACATTTGTCTTCCA-3' and CgCRR: 5'-AACGTTGTAAGCGT-CATGTAAT-3' reported by Aranishi and Okimoto (2005), and waiting for an amplicon of 739 bp. In addition, to amplify a 524 bp segment of the mitochondrial gene NADH subunit 5 (ND5), we used the oligos CgND5.6 F5: 5'-TAGCCCTACAGTTTCATTATCG-3' and CgND5.6 R5: 5'-AAATACTTACAGGAAAAGCGA-3' reported by Kawamura, Miyake, Obata, and Komaru (2017). In both cases, PuRe Taq Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare) mixtures were used and the recommendations of authors for amplification conditions

were followed. Tests performed on temperature gradients of alignment, DNA concentration and concentration of MgCl_2 were also followed. In order to determine the nature of the negative amplifications, we used the universal oligos CAS1S: 5'-GGAATT-GACGGAAGGGCACC-3' and CAS2: 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAAGG-3' reported by Le Roux, Audemard, Barnaud, and Berthe (1999), and that amplify a segment of 521 bp of the 18S rRNA gene. After PCR amplification, electrophoresis was performed on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide for visualization in a MiniBIS system from DNR Bio-Imaging Systems.

2.5 | Environmental variables

Temperature and salinity of seawater were recorded with an YSI multi-sensor probe (model 85) in the cultivation site during each sampling (see 2.2 Performance of oysters during cultivation for dates). Samples of water by triplicate were taken at the same time to estimate the concentration of chlorophyll *a* and seston. The chlorophyll was determined employing the methodology described by Parsons, Maitia, and Lalli (1984), while the seston (organic fraction) was calculated following the procedures described in Strickland and Parsons (1972).

2.6 | Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD. Shell height, shell length, total weight and CI were compared using one-way or two-way ANOVA (depending on the data). In case of significant differences ($p < 0.05$), a multiple comparison test was computed using Tukeys' "Honest Significant Difference" method (Tukey HSD).

3 | RESULTS

3.1 | Oyster performance

The initial shell height of spat at the start the cultivation was 4.2 ± 0.5 mm for H1, 6.3 ± 1.6 for H2, 2.3 ± 0.3 for H3, and 5.1 ± 0.9 for H4; an ANOVA test showed significant differences among all the stocks with a highest height for H2 followed by H4, H1 and H3 in that order. Similarly, the initial weight of spat at the beginning of cultivation was 0.019 ± 0.06 g for H1, 0.029 ± 0.08 g for H2, 0.011 ± 0.06 g for H3 and 0.024 ± 0.07 g for H4; the ANOVA test indicated significant differences with highest weight for H2 followed by H4, H1 and H3, respectively. The growth of different stocks of oysters presented a similar pattern during cultivation in terms of shell size height and length; shell size increments were high during the first months of farming (May–June) then remained relatively stable from July to September to increase again in October until the conclusion of the study period (Figure 2a). Average height at the end of cultivation was 62.1 ± 8.4 mm for H1, 70 ± 6.2 mm for H2, 66.6 ± 7.1 mm for H3 and 65.6 ± 6.4 for H4; the mean height of H2 was statistically higher than H1 and H4, but showed no differences with H3 (Table 1). A two-way ANOVA showed that

the effect of time (month) and origin (hatchery) was significant ($p < 0.05$) indicating that height of oysters from H2, was highest than the height of the other stocks throughout the study period. Nevertheless, the average daily growth of height (mm/day) was greatest for H4, followed by H2, H3 and H1 but not significant differences were detected among them (Table 1). The average length at the termination of experiment was 42.4 ± 5.7 mm for H1, 47 ± 5.4 mm for H2, 44.8 ± 5.3 mm for H3, and 45.3 ± 5.4 mm for H4; statistically, the mean length of H2 did not show differences with H3 and H4 but it was greater than H1. Similarly, the two-way ANOVA showed significant effects of time and hatchery on length, with H2 showing significantly greater length than the rest of the stocks (Figure 2b). Although average daily length growth (mm/day) was different between the stocks ($>H4$, followed by H3, H2 and H1), this did not show significant differences (Table 1).

The average weight of oysters through the cultivation period showed a similar pattern among the different stocks (Figure 3). Total weight increments presented variations from the beginning of the study until mid-August when the weight was comparable between the different stocks. From this point, H1 presented significant lower values than the other hatcheries until the end of the experiment. Another observation is that although H3 had the highest weight at the end of the study, a two-way ANOVA analysis indicated that H2 presented significantly higher values throughout the cultivation period with respect to other hatcheries (Table 1). The mean weight of oysters at the culmination of the cultivation was 22.5 ± 6.2 g for

H1, 31.8 ± 5.9 g for H2, 34.27 ± 8.4 g for H3 and $29.54 \pm$ g for H4; the mean weight of H1 was statistically lower than that of the other three hatcheries. The average daily weight growth (g/day) showed no significant differences among the different stocks but with a highest value for H4 followed by H2, H3 and H1, respectively (Table 1).

The CI at the beginning of the experiment (May) was different among the stocks, being significantly higher for H2 (71.1) and H1 (69.9) compared to H3 (33) (no records for H4 for that date) (Figure 4). Nevertheless, the CI during the next month (beginning June) was quite similar between the four stocks (H1 = 57.5, H2 = 60, H3 = 61.4, H4 = 59.3). Later, the CI showed significant peaks for H1 (86.8) and H2 (93.1) in late June and for H4 (93.5) at the beginning of July, in contrast, H3 did not show a peak but a slight decline in those dates. Condition index diminished for the four stocks and become equal again at the beginning of August, then it showed a similar pattern with low variation until the end of the study. In general, the values remained high (>50) throughout the experiment. A two-way ANOVA showed significant effects of time (month) and origin (hatchery) on CI, in particular, H2 and H4 showed highest values throughout the study period (Table 1). The average CI for the study period was 65.9 ± 11.1 for H1, 71.5 ± 11.3 for H2, 60 ± 11.2 for H3 and 68.9 ± 11.1 for H4.

Most mortalities were observed during the phase of high temperatures (Section 3.4), otherwise survival of oysters was high throughout the study showing values of 97% for H3, 96% for H4, 95% for H2 and 89% for H1 at the end of cultivation.

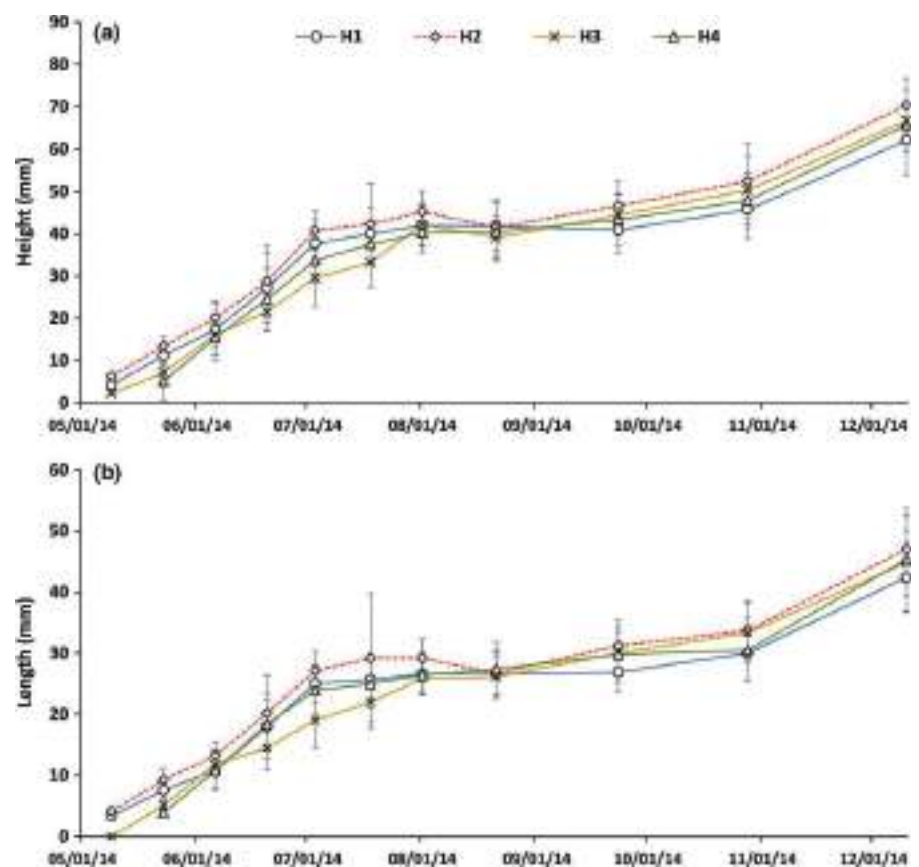


FIGURE 2 Mean variation (\pm SD) of shell height (a) and shell length (b) in suspended cultivation for stocks of oysters *Crassostrea gigas* produced at different hatcheries (H1, H2, H3 and H4) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Factor	Hatcheries			
	1	2	3	4
Mean (\pm SD) of size – weight of oysters (end of cultivation)				
Height (mm)	62.1 \pm 8.4 ^b	70.4 \pm 6.4 ^a	66.7 \pm 7.1 ^{ab}	65.7 \pm 6.5 ^b
Length (mm)	42.4 \pm 5.7 ^b	47.0 \pm 5.5 ^a	44.8 \pm 5.3 ^{ab}	45.3 \pm 8.4 ^{ab}
Weight (g)	22.5 \pm 6.2 ^b	31.8 \pm 5.9 ^a	34.3 \pm 8.5 ^a	29.5 \pm 8.4 ^a
Mean (\pm SD) daily growth rates (end of cultivation)				
Height (mm/day)	0.322 \pm 0.29 ^a	0.346 \pm 0.32 ^a	0.343 \pm 0.25 ^a	0.351 \pm 0.27 ^a
Length (mm/day)	0.208 \pm 0.20 ^a	0.221 \pm 0.21 ^a	0.235 \pm 0.14 ^a	0.235 \pm 0.21 ^a
Weight (g/day)	0.092 \pm 0.08 ^a	0.120 \pm 0.12 ^a	0.119 \pm 0.13 ^a	0.124 \pm 0.09 ^a
Mean (\pm SD) condition index (end of cultivation); Survival (end of cultivation)				
Condition index	65.9 \pm 11.1 ^b	71.5 \pm 11.3 ^a	60.0 \pm 11.2 ^c	69.0 \pm 11.1 ^a
Survival	89%	95%	97%	96%

Note. Different superscripts indicate significant differences in a Tukeys' multiple comparison test.

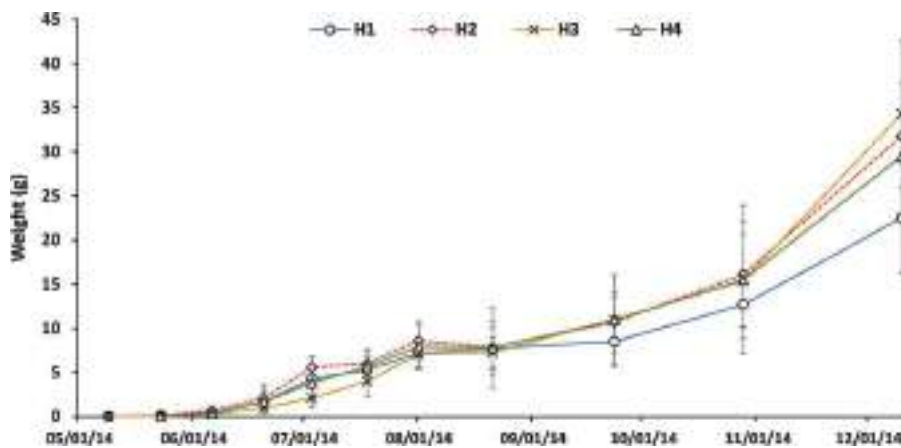


FIGURE 3 Mean variation (\pm SD) of total weight in suspended cultivation for stocks of oysters *Crassostrea gigas* produced at different hatcheries (H1, H2, H3 and H4) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

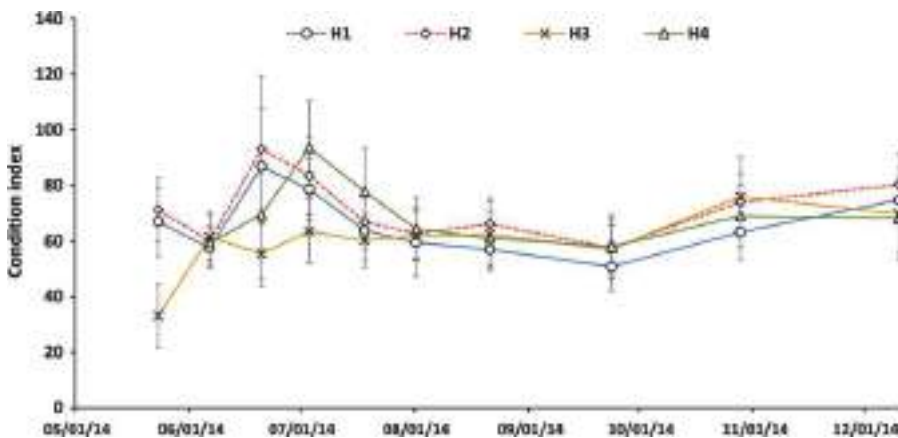


FIGURE 4 Mean variation (\pm SD) of condition index in suspended cultivation for stocks of oysters *Crassostrea gigas* produced at different hatcheries (H1, H2, H3 and H4) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.2 | Pathogens

According to the results of our analyses and considering the hatchery stage, the spat of the four different stocks of oyster did not show evidence of the presence of OsHv-1, *Marteilia refringens* and *Perkinsus marinus* before seeding. In the same way, no evidence was found of the presence of these pathogens in adult oysters in any of the stocks after 9 months of cultivation.

3.3 | Genetic variability

The determination of genetic variability of each stock was not achieved because it was not possible to obtain amplicons of the two mitochondrial regions, neither with the original conditions reported by the authors, nor with the gradient tests. However, because the universal oligos corroborated the integrity and good quality of the oyster DNA extract, an analysis of the design quality

of the oligos was carried out using the Multiple Primer Analyzer software available online at www.thermofisher.com. This analysis showed that the oligos reported by Aranishi and Okimoto (2005) form cross dimers, being unusable for the amplification of the oyster DNA.

3.4 | Environmental variables

Temperature showed the typical pattern observed in lagoons of the Gulf of California with increasing values in spring, high values during summer and part of autumn and low values in winter. Thus, the higher temperature (33°C) was registered in August, the lower (19.1°C) in December, and the mean was $29.3 \pm 4^\circ\text{C}$ (Figure 5a). Salinity also showed a characteristic pattern with hypersaline conditions; all the values were >35 mg/L, the maximum was observed in June (40 mg/L), the minimum in September (35.2 mg/L) and the mean was 37.5 ± 1.3 mg/L (Figure 5a). The concentrations of chlorophyll showed two peaks, the first and most important in July (6.5 ± 0.1 µg/L), and the second in September (5.8 ± 0.5 µg/L). The minimum concentration was detected in May (1.4 ± 0.2 µg/L), and the mean was 3.1 ± 1.7 µg/L (Figure 5b). The organic fraction of seston showed the highest value at the beginning of study (10.3 ± 0.5 mg/L), then the values decreased until 5.2 ± 0.1 mg/L in June. There was a peak in July (8.9 ± 0.6 mg/L), then concentrations decreased constantly until the end of the study showing the lower value (4.9 ± 0.2 mg/L) in December (Figure 5b).

4 | DISCUSSION

We found that to make comparisons of the biological performance between different spat stocks, there were several aspects to consider, of which some were not controlled and others were difficult to manage; all these factors limited the scope of this study. In this sense, it is intended here to expose the findings as a contribution to the knowledge when these types of problems are addressed, and describe the difficulties encountered as a way that these can be considered in future studies.

4.1 | Size of the spat

The experiment was designed to begin with the most homogeneous conditions possible, but the first drawback was that all hatcheries sent spat outside the agreed range (3–4 mm). The difficulty of finding homogeneity in the spat sizes is a recurrent problem and widely reported by oyster farmers in the region, and is a limiting factor in the standardization of Japanese oyster production in Mexico. While to comply with the demanded size of spat, hatcheries should have shortened or lengthened their production protocols to coincide size with dates, this could generate mismatches in the production phases altering all the processes. This in itself is an extra variable that may affect performance of spat in the field. Therefore, this aspect it is difficult to overcome since it is very unlikely that hatcheries working at different sites with distinct schedules will produce spat with equivalent size for a specific date. Another aspect that generated

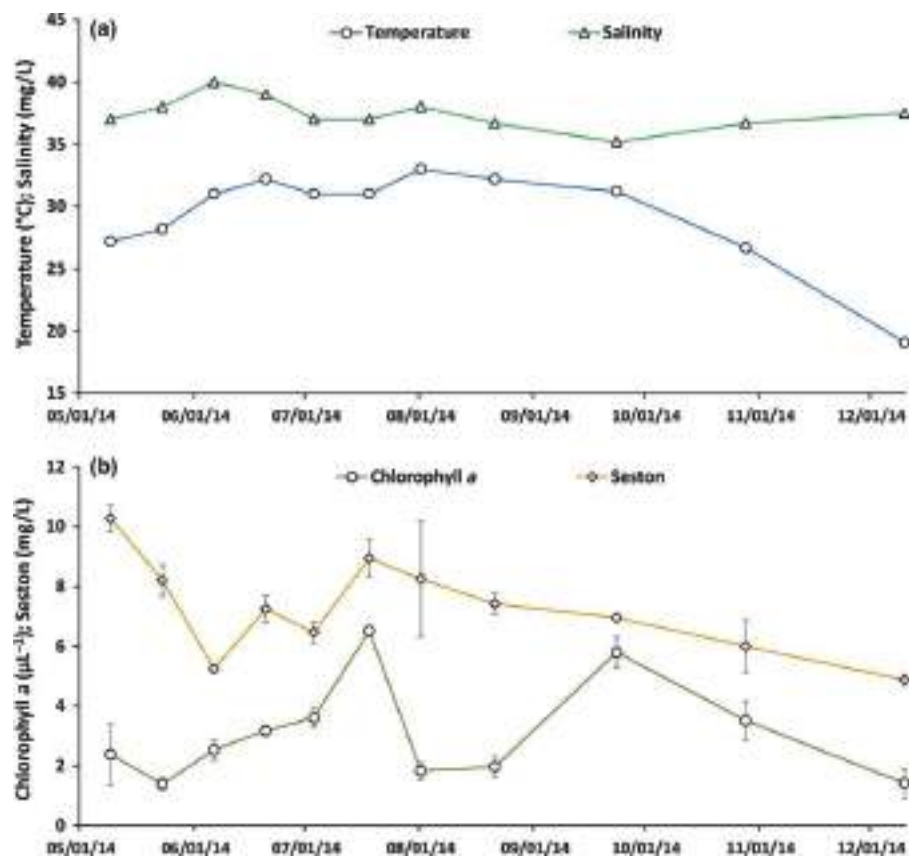


FIGURE 5 Temperature and salinity records (a) and chlorophyll *a* and seston concentrations (b) in La Cruz lagoon during the cultivation of oysters [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

obstacles was the date of spat delivery because spat from H2 and H4 was received 6 days later, and therefore, the seeding was not at the same time for all the stocks. Although it is possible to have a better control on the date of spat delivery, it is difficult to know if this aspect could have had an effect on the results.

The cultivation started with significant variations of spat size among the different stocks, which could be an advantage for the spat with higher size. However, this may be relative because other researchers have reported that the initial size does not define necessarily the biological performance, nor the final size of the organisms for aquaculture activities (Pieterse, Pitcher, Naidoo, & Jackson, 2012; Gallo-García, García-Ulloa-Gómez, Godínez-Siordia, & Rivera-Gómez, 2014). The same response was observed in this study with H3; these oysters had the smallest height at the beginning of the study but finished with the second best shell size and the highest weight. There are other factors that appear to have a greater influence on the biological performance of organisms, as the genetic attributes of the spat, the type of cultivation system, the densities used, etc. (Chávez-Villalba, 2014; Dégremont et al., 2005; Kong, Li, Yu, & Kong, 2015).

4.2 | Performance of stocks during cultivation

Even though the size of the spat was different, the stocks followed a similar growth pattern along the cultivation period. The development of oysters was characterized by fast growth during part of spring and beginning of summer, next the growth decreased strongly and remained relatively constant during the summer and part of autumn. Finally, the growth rate increased again by the end of autumn–beginning of winter. If we observe in detail, even though the pattern is similar, the growth curve of each stock of oysters presented certain variations that made them different from each other. For instance, H2 was the stock with highest values in height, length and weight throughout the study period, while H1 presented good performance until the middle of the experiment but then decreased, and at the end, its height, length and weight were the lowest of the four lots. Conversely, H3 had the lowest values at the beginning of the study and these remained low until the middle of experiment, but then a recovery of the growth was observed and this stock finished with a good performance. H4 showed an intermediate performance when compared to the other stocks. In terms of daily growth rates (height, length and weight) there was a change in terms that H4 showed the highest values, followed by H2, H3 and H1 respectively. All these differences, although small in some cases, represent variations in spat attributes among the stocks.

The response of the different stocks to variation of environmental variables seemed similar. It is known that the most important factors affecting growth and condition of *C. gigas* are availability of food and temperature (Haoui-Meslem, Chávez-Villalba, Alcántara-Razo, & Rebzani-Zahaf, 2017; Roncarti, Felici, Magi, Bilandžić, & Melotti, 2017). For instance, Ren and Schiel (2008) demonstrated that concentrations of chlorophyll less than 2 µg/L represent the most important source for the growth of *C. gigas*. In our study, the concentration of chlorophyll throughout the study showed a mean

of 3 ± 1.6 µg/L while the concentrations of the organic fraction of seston were higher than those reported for other lagoons of the Gulf of California (Meling-López, Martínez-Camacho, & Duarte-Fuentes, 2008). Therefore, the oysters had access to abundant food to support growth during the entire cultivation period. Temperature, on the other hand, showed a marked seasonality with values $>30^{\circ}\text{C}$ from June to September, which is a typical pattern in this lagoon (Castro-Longoria & Grijalva-Chon, 1991; Valenzuela-Castillo, Sánchez-Paz, Castro-Longoria, López-Torres, & Grijalva-Chon, 2015). This temperature pattern seems to determine the type of shell growth that the oysters follow. When the stocks were seeded, the temperature was 27°C with an ascending pattern, this allowed fast growth rates from May to beginning of July even when oysters were exposed to temperatures higher than 30°C . Although *C. gigas* can withstand temperatures up to 35°C (Dutertre, Beninger, Barillé, Papin, & Haure, 2010), the long exposure to high temperatures had the effect of decreasing growth significantly. This occurred from the beginning of July to the end of September even when the oysters had high food availability. Growth rates increased again in October–December due to temperatures started a decreasing pattern. Considering the stocks independently, their responses in shell growth were different according to the three phases of temperature observed (increasing, high and descending). During increasing temperatures the highest daily growth rate was for H4, followed by H2, H1 and H3; through high temperatures the greatest rate was for H3, followed by H4, H2 and H1; and during descending temperatures was H2, and then H4, H3 and H1 (Table 2). Although this growth pattern associated to temperature variation was already described in this same lagoon for the species by Chávez-Villalba, Arreola-Lizárraga, Burrola-Sánchez, and Hoyos-Chairez (2010), and by Góngora-Gómez, Aragón-Noriega, Domínguez-Orozco, and Villanueva-Fonseca (2017) in Ensenada-Pabellones lagoon (Sinaloa), this had never been reported for four different lots of oysters cultivated at the same time.

The effect of temperature was different on weight increments than on shell growth. During the phase of increasing temperatures, the growth in weight started slow but later the rates increased and remained until the beginning of August. The effect of high temperatures seemed to affect only during August because the growth practically stopped during this month. Later, the growth augmented again within the phase of temperatures $>30^{\circ}\text{C}$ (except for H1), and during the phase of temperature decline, significant weight increases were observed, especially in the last month of cultivation. As occurred for shell growth, the response of weight increments in oysters was different for every stock in relation to each temperature phase. In increasing temperatures the highest daily weight growth was detected in H4, followed by H2, H1 and H3; during high temperatures was H3, then H1, H2 and H4; and through descending temperatures was H3, H2, H4 and H1 respectively (Table 2). Despite the former differences, the general pattern suggests that oysters can gain weight, particularly in soft tissues, even if shell growth decreases during the phase of high temperature. The decoupling between the growth of the shell and the tissues has been reported for the species, but in this case the shell continues to grow while

the gain in weight is delayed due to little availability of food (Brown & Hartwick, 1988). This pattern was also detected in oysters cultivated in La Cruz lagoon when compared with oysters cultivated outside the lagoon (Chávez-Villalba et al., 2010). The difference observed in this study is that due to the availability of food, the oysters channeled the energy to form tissue instead of producing shell.

In terms of CI, H1, H2 and H4 showed similar patterns with peaks during June-July while H3 did not show a significant peak throughout the study. The peaks occurred when is the gamete growing of the species and the decrease in CI may indicate spawning events (Chávez-Villalba, Villelas-Ávila, & Cáceres-Martínez, 2007). Condition index is a useful tool to monitor reproductive activity in *C. gigas* because it reflects variations in gamete development (Haoui-Meslem et al., 2017). Although the oysters were still young during June-July, the peaks apparently reflected partial growth of the gonads with probable presence of some mature gametes. Nevertheless, it has been reported that in this lagoon, *C. gigas* does not spawn and reabsorb the gametes within the gonad (Chávez-Villalba et al., 2007). The peaks could also be associated with the storage of nutrients, and the energy from them could have been channeled to help withstand the difficult conditions associated to high temperatures. The former because the Pacific oyster is able to store large concentrations of energy from nutrients during abundance of food sources, which allows it to develop even at low concentrations of food (Racotta, Ramírez, Ávila, & Ibarra, 1998). Nevertheless, H3 showed a different scenario; these oysters started cultivation with low CI but also with low size and weight, therefore, the availability of food and nutrients seem to have served to recover in all aspects and maintain a good CI throughout the study. The response of each stock in terms of CI to each temperature phase was different; during increasing temperatures the highest CI mean was for H2, followed by H1, H4 and H3, for high temperatures the greatest CI was for H4, then H2, H3 and H1, and for descending temperatures was H2 in first term, followed by H3, H1 and H4 (Table 2). Although stocks responded

differently to temperature, the general pattern was that all stocks showed elevated CI throughout the cultivation.

Previous observations indicate that the performance of each spat stock was different when transferred to the field for cultivation. Although such differences are relatively small, we consider that could be due mainly to variations in production protocols among hatcheries and by the difference of origin of each stock. There are an infinity of factors that could affect spat production, such as technical and technological aspects (adjustments to production protocols, experience of operators, available infrastructure), including commercial aspects such as certifications and marketing structure. Also biological elements such as the quality of broodstock, since its genetic variability provides better attributes to the spat, reflected in a better performance (Dégremont, Ernande, Bédier, & Boudry, 2007; Dégremont et al., 2015). Likewise, the quality of the microalgae produced, this determines the quality of the gametes produced and the physiological condition of larvae (Liu et al., 2016; Rico-Villa, Pouvreau, & Robert, 2009), among others. It is evident that more studies are required to elucidate the role of production protocols on the performance of spat.

On the other hand, for aquaculture purposes and considering the necessity to indicate to oyster farmers which are the best hatcheries for spat production, the differences are relative. Although H2 showed greater size, higher weight and better CI, we cannot discard the other hatcheries because the differences are small in terms of oyster production. If consider for example the mean daily growth rate of the shell for each stock (between 0.322 and 0.351 mm/day), all were higher than the average (0.290 mm/day) reported for this type of cultivation system in several studies conducted in various lagoons of the Gulf of California and on the Pacific coast of the Baja California peninsula (Chávez-Villalba, 2014). This signifies that all stocks showed good growth rates, and although with some time difference, all would reach the commercial size within the expected time of cultivation. If we add that the lots presented high condition indices and high survival, all the stocks become good alternatives for

TABLE 2 Mean daily growth rates and condition indices of four stocks of *Crassostrea gigas* oysters during different temperature conditions; increasing (27–30°C), high (>30°C) and decreasing (30–19°C). The highest values are in bold

Factor	Hatcheries			
	1	2	3	4
Height (mm/day; mean ± SD)				
Increasing temperatures	0.611 ± 0.17	0.649 ± 0.19	0.498 ± 0.14	0.688 ± 0.03
High temperatures	0.065 ± 0.09	0.069 ± 0.10	0.222 ± 0.32	0.137 ± 0.11
Decreasing temperatures	0.259 ± 0.17	0.292 ± 0.17	0.275 ± 0.15	0.273 ± 0.20
Weight (g/day; mean ± SD)				
Increasing temperatures	0.080 ± 0.08	0.105 ± 0.11	0.039 ± 0.03	0.094 ± 0.07
High temperatures	0.063 ± 0.05	0.065 ± 0.09	0.118 ± 0.09	0.093 ± 0.07
Decreasing temperatures	0.174 ± 0.08	0.260 ± 0.15	0.283 ± 0.22	0.229 ± 0.14
Condition index (mean ± SD)				
Increasing temperatures	72.5 ± 12.9	76.9 ± 14.4	53.3 ± 14.0	74.1 ± 14.5
High temperatures	57.7 ± 5.5	63.2 ± 4.3	60.4 ± 2.4	65.3 ± 8.8
Decreasing temperatures	68.9 ± 8.2	77.1 ± 4.5	72.8 ± 4.4	68.6 ± 0.7

production. The considerations that the oyster farmers would have to make would be in relation to the price of the spat, delivery time, etc.

4.3 | Pathogens

Oystermen in Mexico sometimes complain in relation to the performance of spat they buy in hatcheries, particularly when a spat lot shows problems of early mortality. In these cases, they use to say that is because the spat shows low quality or juveniles are affected by some disease. Although hatcheries are required by law to make analyzes that guarantee that the spat is free of pathogens, we wanted to confirm the results by doing analysis on the spat of each hatchery in relation to the presence of ostreid herpesvirus OsHV-1, *Marteilia refringens* and *Perkinsus marinus*. These pathogens, particularly OsHV-1, is the etiological agent of a highly prevalent viral infection affecting and producing severe mortalities in all life stages of *C. gigas* worldwide (Pernet et al., 2012; Renault, 2016). This pathogen, together with *M. refringens* and *P. marinus* have been reported in hatcheries and cultivated oysters (including *C. corteziensis*) in the Gulf of California (Grijalva-Chon, Castro-Longoria, Enríquez-Espinoza, Maeda-Martínez, & Mendoza-Cano, 2015; Martínez-García et al., 2017; De la Re-Vega et al., 2017). Because of this, we also tested adult oysters at the end of the cultivation considering that their immune response could be compromised by the critical phase of high temperatures. It has been found that sudden changes in temperature and salinity can favor the proliferation of pathogens (Brown, 1988; Fuhrmann, Delisle, Petton, Corporeau, & Pernet, 2018; Spencer, 2008). In none of the two cases the presence of these pathogens was detected, suggesting that the protocols to prevent pathogens during spat production are giving good results and that stocks show good resistance to infection during cultivation.

4.4 | Genetic variability

It has been reported that there are differences in biological performance during cultivation linked to the origin of the spat (Nel, Pitcher, Richoux, & Jackson, 2014). Because the stocks had different origin, we believe that determining their genetic variability could give us elements to better understand the differences in growth among them. However, this aspect represented another drawback for the objectives of the study. The analysis was carried out amplifying the mitochondrial DNA control region based on the oligos and amplification conditions reported by Aranishi and Okimoto (2005). However, this process was unsuccessful, and a later analysis in the Multiple Primer Analyzer software showed that previous oligos generated dimers, what makes them unusable for the amplification of DNA in all the oyster stocks. One explanation to our results could be the time the species has remained isolated from populations of Japan since it was introduced to Mexico. During more than 40 years, broodstock has been imported from several countries (mainly United States and Chile) and there have been many crosses between different lots and oyster lines supplying great quantity of new genetic

material. Is necessary therefore, that nucleotide sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region be analyzed in *C. gigas* from cultured individuals within Mexican waters or from oysters of nearest populations (USA and Canada). Besides, more studies on genetics are necessary for *C. gigas* not only in Mexico but in all the countries of America where the species has been recently introduced. Normally, in emerging hatcheries the selection of broodstock is based on physical characteristics instead of genetic attributes due to absence of studies on family-based selective breeding programs. The studies should be focused on determining genetic variability of broodstock since this transfers the attributes or undesirable traits to offspring (spat), which will be reflected in the yield and survival of oysters during cultivation (Dégremont et al., 2007; De Melo, Morvezen, Durland, & Langdon, 2018; Samain et al., 2007; Yu & Li & Yu, 2008).

5 | CONCLUSIONS

The four stocks showed similar growth patterns in general, but in observing the series of variations that each one presented, it can be concluded that each stock exhibited a distinctive pattern which indicate disparities in variations of production protocols, broodstock origin and other factors. This may be the result of the specific protocol each hatchery employs, the hatchery location and water supply, and the traits broodstock transfer to spat. The influence of broodstock could have been better understood through the analysis of its genetic variability. However, these or similar analyses are necessary to be implemented in hatcheries to maintain an acceptable level of heterozygosity and minimal inbreeding.

Although the variations in growth patterns can be detected comparing the values of height, weight and CI among stocks, other types of analysis are required to determine more clearly such differences. An alternative could be to apply growth models to the data (Burnham & Anderson, 2002), and use tools as the multi-model inference and information theory (Katsanevakis, 2006). This approach may allow to identify the growth model that best represents the individual growth of each stock.

The results indicate that temperature is the governing factor influencing growth rates in this species, but the effect of this variable was different on every stock and depending on whether the temperature increases, stays high or decreases. Likewise, the effect of temperature seems stronger on shell growth than on weight growth since shell increments decrease during most part of summer but weight only declines during one month. Conversely, the great food availability seems to have helped the organisms undergo the critical phase of high temperatures and permitted that oysters showed elevated condition throughout the cultivation.

In terms of aquaculture purposes, the performance of all stocks was within the criteria for an adequate production of oysters in the region, because the organisms presented high growth rates, elevated survival, as well as a high CI. The oyster farmers then have the option of selecting the spat that best suits them, probably focusing more on aspects as price, delivery time, etc.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to Martín Acedo-Valdez (UNISON), Víctor Vera and Francisco Hoyos-Chairez (CREMES), Edgar Alcántara-Razo and Andrés Hernández-Ibarra (CIBNOR), for their logistic support in the field. This study was funded by Fundación Produce Sonora (project 898-1) with additional support from CIBNOR (project 900-721). Reynaga-Franco, F., was a recipient of a fellowship from CONACYT Mexico.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

This study complies with national and international guide-lines for animal studies. The current study followed the research ethics of University of Sonora and CIBNOR.

ORCID

José-Manuel Grijalva-Chon  <https://orcid.org/0000-0002-7215-918X>

Jorge Chávez-Villalba  <https://orcid.org/0000-0002-3517-0355>

REFERENCES

- Akashige, S., & Kusuki, Y. (1996). Artificial induction and larval survival of triploids in the oyster *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the Hiroshima Fisheries Experimental Station*, 19, 1–20.
- Aranishi, F., & Okimoto, T. (2005). Sequence polymorphism in a novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. *Journal of Applied Genetics*, 46, 201–206. [10.1007/BF03194610](https://doi.org/10.1007/BF03194610)
- Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J., Baldi, Y., ... Bouchoucha, M. (2014). Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*, 141, 227–240. [10.1017/S0031182013001418](https://doi.org/10.1017/S0031182013001418)
- Audemard, C., Reece, K. S., & Bureson, E. M. (2004). Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6611–6618. [10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004)
- Barraza-Guardado, R. H., Chávez-Villalba, J., Atilano-Silva, H., & Hoyos-Chairez, F. (2009). Seasonal variation in the condition index of Pacific oyster postlarvae *Crassostrea gigas* in a land-based nursery in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 40, 118–128. [10.1111/j.1365-2109.2008.02076.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02076.x)
- Barton, A., Waldbusser, G. G., Feely, R. A., Weisberg, S. B., Newton, J. A., Hales, B., ... McLaughlin, K. (2015). Impacts of coastal acidification on the Pacific Northwest shellfish industry and adaptation strategies implemented in response. *Oceanography*, 28(2), 146–159. [10.5670/oceanog.2015.38](https://doi.org/10.5670/oceanog.2015.38)
- Brown, J. R. (1988). Multivariate analyses of the role of environmental factors in seasonal and site-related growth variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Ecology Progress Series*, 45, 225–236. <https://doi.org/10.3354/meps045225>
- Brown, J. R., & Hartwick, E. B. (1988). Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Absolute and allometric growth, 70, 231–251. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90099-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90099-3)
- Burge, C. A., Judah, L. R., Conquest, L. L., Griffin, F. J., Cheney, D. P., Suhrbier, A., ... Friedman, C. S. (2007). Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) grown in Tomales Bay, California, USA: The influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *Journal of Shellfish Research*, 26, 163–172. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[163:SSMOTP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[163:SSMOTP]2.0.CO;2)
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach*, 2nd ed.. New York, NY: Springer Science & Business Media.
- Casas, S. M., La Peyre, J. F., Reece, K. S., Azevedo, C., & Villalba, A. (2002). Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of Aquatic Organism*, 52, 217–231. [10.3354/dao052217](https://doi.org/10.3354/dao052217)
- Castro-Longoria, R., & Grijalva-Chon, J. M. (1991). Variabilidad espacio-temporal de nutrientes y seston en la laguna costera La Cruz, Sonora. *Ciencias Marinas*, 17, 83–97.
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24, 175–190.
- Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A., Burrola-Sánchez, S., & Hoyos-Chairez, F. (2010). Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture*, 300(1–4), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.012>
- Chávez-Villalba, J., Hernández-Ibarra, A., López-Tapia, M. R., & Mazón-Suástegui, J. M. (2008). Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from northwestern Mexico: Growth, gametogenic activity, and condition index. *Journal of Shellfish Research*, 27, 711–720. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[711:PCOTCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[711:PCOTCO]2.0.CO;2)
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J. C., & Pennec, M. L. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: Origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214, 115–130. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00898-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00898-5)
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R., & Cáceres-Martínez, C. (2007). Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 38, 268–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01662.x>
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quéré, C., Boudry, P., ... Madec, S. (2012). Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*, 75, 5554–5563. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.040>
- Da Costa, F., Petton, B., Mingant, C., Bougaran, G., Rouxel, C., Quéré, C., ... Robert, R. (2016). Influence of one selected *Tisochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquaculture Nutrition*, 22, 813–836. <https://doi.org/10.1111/anu.12301>
- De la Re-Vega, E., Sánchez-Paz, A., Gallardo-Ybarra, C., Lastra-Encinas, M. A., Castro-Longoria, R., Grijalva-Chon, J. M., ... Maldonado-Arce, A. D. (2017). The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hsp70 modulates the ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.079>
- De Melo, C. M., Morvezen, R., Durland, E., & Langdon, C. (2018). Genetic by environment interactions for harvest traits of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) across different environments on the West Coast, USA. *Journal of Shellfish Research*, 37, 49–61. <https://doi.org/10.2983/035.037.0104>
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., ... Boudry, P. (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 249(1–4), 213–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.046>
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., & Boudry, P. (2007). Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I.

- Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture*, 262, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.025>
- Dégremont, L., Lamy, J. B., Pépin, J. F., Travers, M. A., & Renault, T. (2015). New insight for the genetic evaluation of resistance to ostreid herpesvirus infection, a worldwide disease. *Crassostrea Gigas*. *Plos One*, 10(6), e0127917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127917>
- Diederich, S., Nehls, G., Beusekom, J. V., & Reise, K. (2005). Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: Invasion accelerated by warm summers? *Helgolander Marine Research*, 59, 97–106. <https://doi.org/10.1007/s10152-004-0195-1>
- Dutertre, M., Beninger, P. G., Barillé, L., Papin, M., & Haure, J. (2010). Rising water temperatures, reproduction and recruitment of an invasive oyster, *Crassostrea gigas*, on the French Atlantic coast. *Marine Environmental Research*, 69, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.07.002>
- Enríquez-Espinoza, T., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., & Ramos-Paredes, J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89, 269–273. <https://doi.org/10.3354/dao02199>
- FAO (2017). Species fact sheets, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). FAO, Fisheries and Aquaculture Department [Document online]. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>.
- Friedman, C. S., Estes, R. M., Stokes, N. A., Burge, C. A., Hargove, J. S., Barber, B. J., ... Reece, S. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 33–41. [10.3354/dao063033](https://doi.org/10.3354/dao063033)
- Fuhrmann, M., Delisle, L., Petton, B., Corporeau, C., & Pernet, F. (2018). Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biology Open*, 7, bio028134. [10.1242/bio.028134](https://doi.org/10.1242/bio.028134) Published 20 February 2018
- Gallo-García, M. D. C., García-Ulloa-Gómez, M., Godínez-Siordia, D., & Rivera-Gómez, K. (2014). Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 17, 83–91.
- Góngora-Gómez, A. M., Aragón-Noriega, E. A., Domínguez-Orozco, A. L., & Villanueva-Fonseca, B. P. (2017). Modeling the individual growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated in the Gulf of California using the von Bertalanffy model. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52, 181–185. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000100017>
- Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., Enríquez-Espinoza, T. L., Maeda-Martínez, A. N., & Mendoza-Cano, F. (2015). Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43, 776–780.
- Grijalva-Chon, J. M., Izaguirre-Castro, O., Castro-Longoria, R., López-Torres, M. A., & Hoyos-Chairez, F. (2013). Variabilidad genética en ADN microsatélite de un nuevo linaje de ostión (*Crassostrea gigas*) en Sonora. *Biocencia*, 15, 12–18. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i1.130>
- Guo, X., Ford, S. E., & Zhang, F. (1999). Molluscan aquaculture in China. *Journal of Shellfish Research*, 18, 19–31.
- Haoui-Meslem, N., Chávez-Villalba, J., Alcántara-Razo, E., & Rebzani-Zahaf, C. (2017). Growth, condition and gametogenic activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Algeria. *Cahiers de Biologie Marine*, 58, 153–161. [10.21411/CBM.ACD206125](https://doi.org/10.21411/CBM.ACD206125)
- Helm, M. M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2004). *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*, 1st ed.. Rome, Italy: Food and agriculture organization of the United Nations.
- Hoyos-Chairez, F. (2004). *Ostricultura sonorensis. Antecedentes, presente y perspectiva de desarrollo sustentable*. (pp. 29–30). Hermosillo, México: Memorias del Foro sobre Agricultura y Desarrollo Rural Sustentable.
- Katsanevakis, S. (2006). Modelling fish growth: Model selection, multi-model inference and model selection uncertainty. *Fisheries Research*, 81, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.07.002>
- Kawamura, K., Miyake, T., Obata, M., Aoki, H., & Komaru, A. (2017). Population demography and genetic characteristics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70 (211), 221. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.12.006>
- Kong, N., Li, Q., Yu, H., & Kong, L. F. (2015). Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree. *Aquaculture Research*, 46, 499–508. <https://doi.org/10.1111/are.12205>
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A., & Berthe, F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology*, 1(6), 588–597. <https://doi.org/10.1007/PL00011814>
- Liu, A., Mazumder, D., Dove, M. C., Lai, T. S., Crawford, J., & Sammut, J. (2016). Stable isotope analysis of the contribution of microalgal diets to the growth and survival of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1799) larvae. *Journal of Shellfish Research*, 35, 63–69. <https://doi.org/10.2983/035.035.0108>
- López-Flores, I., De La Herran, R., Garrido-Ramos, M., Navas, J., Ruiz-Rejon, C., & Ruiz-Rejon, M. (2004). The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, 129(411), 419. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005827>
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., & Cachot, J. (2013). Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 89, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.04.003>
- Martínez-García, M. F., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., Chávez-Villalba, J. L., Enríquez-Espinoza, T. L., Maeda-Martínez, ... E. (2017). OsHV-1 and notifiable protozoa in healthy *Crassostrea corteziensis* cultured in two distant areas of the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45, 699–707. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue4-fulltext-6>
- Meling-López, A. E., Martínez-Camacho, C. I., & Duarte-Fuentes, G. A. (2008). Estructura poblacional y biología de la araña espinosa (*Micrathena funebris* marx, 1898) del manglar del estero La Cruz, Bahía Kino, Sonora. *Biocencia*, 10, 38–47. <https://doi.org/10.18633/bt.v10i3.56>
- Miossec, L., Le Deuff, R. M., & Gouletquer, P. (2009). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Cooperative Research Report*, 299, 11–16.
- Nel, A., Pitcher, G., Richoux, N., & Jackson, S. (2014). Culture environment and hatchery of origin influence growth, condition and feeding organ morphology in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in South Africa. *African Journal of Marine Science*, 36, 481–491. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2014.982187>
- Neto, R. M., Zeni, T. O., Ludwig, S., Horodesky, A., Giroto, M. V., Castilho-Westphal, G. G., & Ostrensky, A. (2013). Influence of environmental variables on the growth and reproductive cycle of *Crassostrea* (Mollusca, Bivalvia) in Guaratuba Bay, Brazil. *Invertebrate Reproduction & Development*, 57, 208–218. <https://doi.org/10.1080/07924259.2012.747449>
- Parsons, T. R., Maitia, Y., & Lalli, C. M. (1984). *A manual of chemical and biological methods for sea water analysis*, (1st ed.). Oxford, UK: Pergamon Press.
- Pernet, F., Barret, J., LeGall, P., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., ... N. (2012). Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infection diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau Lagoon, France. *Aquaculture Environmental Interactions*, 2, 215–237. <https://doi.org/10.3354/aei00041>
- Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., & Pernet, F. (2015). Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environmental Interactions*, 6(3), 205–222. <https://doi.org/10.3354/aei00125>

- Pieterse, A., Pitcher, G., Naidoo, P., & Jackson, S. (2012). Growth and condition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* at three environmentally distinct South African oyster farms. *Journal of Shellfish Research*, 31(4), 1061–1076.
- Ponis, E., Parisi, G., Zitteli, G. C., Lavista, F., Robert, R., & Tredici, M. R. (2008). *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.010>
- Racotta, I. S., Ramírez, J. L., Ávila, S., & Ibarra, A. M. (1998). Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture*, 163, 111–122. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00226-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00226-9)
- Ren, J. S., & Schiel, D. R. (2008). A dynamic energy budget model: Parameterisation and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 361, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.04.012>
- Renault, T. (2016). Malacoherpesviruses of Mollusks. In F. S. B. Kibenge & M. Godoy (Eds.), *Aquaculture Virology* (pp. 513–524). Ottawa, ON: Academic Press.
- Renault, T., Le Deuff, R. M., Chollet, B., Cochenec, N., & Gerard, A. (2000). Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42, 173–183. <https://doi.org/10.3354/dao042173>
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., & Robert, R. (2009). Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 287, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.054>
- Robert, R., & Gérard, A. (1999). Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*, 12, 121–130. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80021-7)
- Roncarati, A., Felici, A., Magi, G. E., Bilandžić, N., & Melotti, P. (2017). Growth and survival of cupped oysters (*Crassostrea gigas*) during nursery and pregrowing stages in open sea facilities using different stocking densities. *Aquaculture International*, 25, 1777–1785. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0152-z>
- Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., & Delaporte, M. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268, 227–243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.044>
- Solomieu, V. B., Renault, T., & Travers, M. A. (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J. F., & Sorgelos, P. (1999). Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 123, 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00063-2)
- Spencer, B. (2008). *Molluscan shellfish farming*, 2nd ed.. Oxford, UK: John Wiley & Sons.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*, 2nd ed.. Ottawa, ON: Fisheries Research Board of Canada.
- Uriarte, I. (2008). Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. In A. Lovatelli, A. Farías, & I. Uriarte (Eds.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina* (pp. 61–75). Puerto Montt: FAO Actas de Pesca y Acuicultura.
- Utting, S. D., & Helm, M. (1985). Improvement of sea water quality by physical and chemical pre-treatment in a bivalve hatchery. *Aquaculture*, 44, 133–144. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90016-X)
- Utting, S. D., & Spencer, B. E. (1991). *The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Laboratory Leaflet No. 68, Ministry of Agriculture*. Lowestoft, UK: Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research.
- Valenzuela-Castillo, A., Sánchez-Paz, A., Castro-Longoria, R., López-Torres, M. A., & Grijalva-Chon, J. M. (2015). Seasonal changes in gene expression and polymorphism in hsp70 in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. *Marine Environmental Research*, 110, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.019>
- Vigneron, V., Sollic, G., Montanié, H., & Renault, T. (2004). Detection of ostreid herpesvirus 1 (OsHv-1) DNA in seawater by PCR: Influence of water parameters in bioassays. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62, 35–44. <https://doi.org/10.3354/dao062035>
- Volkman, J., Jeffrey, S., Nichols, P., Rogers, G., & Garland, C. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128, 219–240. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4)
- Walne, P., & Mann, R. (1975). Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In H. Barnes (Ed.), *Ninth european marine biology symposium* (pp. 587–607). Scotland, UK: Aberdeen University Press.
- Yu, H., Li, Q., & Yu, R. (2008). Genetic differentiation between the oyster *Crassostrea plicatula* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations in China assessed by microsatellite analysis. *Fisheries Science*, 74, 88–97. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01499.x>

How to cite this article: Reynaga-Franco F-d-J, Grijalva-Chon J-M, Castro-Longoria R, Barraza-Guardado R-H, Arreola-Lizárraga J-A, Chávez-Villalba J. Biological performance of *Crassostrea gigas* stocks produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions. *Aquac Res.* 2019;50:621–633. <https://doi.org/10.1111/are.13940>

Influencia de la variabilidad ambiental de la Laguna la Cruz (Sonora) en el crecimiento y condición del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

Influence of environmental variability of La Cruz Lagoon (Sonora) on growth and condition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Felipe de Jesús Reynaga-Franco¹, Jorge Chávez-Villalba², Ramón Héctor Barraza-Guardado¹, Edgar Alcántara-Razo², José Alfredo Arreola-Lizárraga², Reina Castro-Longoria¹ y José Manuel Grijalva-Chon^{1*}

¹ Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Av. Luis D. Colosio s/n, Hermosillo, Sonora 83000, México.

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Sonora, Apdo. Postal 349, Guaymas, Sonora 85454, México.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la temperatura, salinidad, oxígeno, clorofila *a* y seston sobre el crecimiento y condición de ostiones *Crassostrea gigas* cultivados en la laguna La Cruz (Sonora, México). Se realizaron biometrías (altura, longitud y peso) quincenales (abril-agosto) y mensuales (septiembre-diciembre) de los ostiones y se utilizó la inferencia multimodelo para describir el crecimiento. Se determinó por análisis de PCR que los patógenos (*OsHV-1*, *Marteilia refringens* y *Perkinsus marinus*) estuvieron ausentes en semillas y ostiones adultos. La temperatura influyó el crecimiento y la condición cuando se presentaron los valores máximos en verano. En este periodo los ostiones detienen su crecimiento en concha pero el alimento disponible, indicado por la clorofila y seston, permite la formación de carne. Esta estrategia parece una adaptación de los ostiones a la variación de temperatura y sitúa su desarrollo óptimo entre 20-30 °C. En estas condiciones, el modelo que mejor describió el crecimiento fue el Schnute caso 1. Estos resultados demuestran que a pesar de temperaturas extremas los ostiones tuvieron un buen desarrollo durante su cultivo.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, ostión del Pacífico, acuicultura, modelo de Schnute, Golfo de California.

ABSTRACT

It was studied the effect of temperature, salinity, oxygen, chlorophyll *a* and seston on the growth and condition of *Crassostrea gigas* oysters cultivated in La Cruz lagoon (Sonora, Mexico). Biometrics (height, length and weight) of oysters were carried out fortnightly (April-August) and monthly (September-December), and multimode inference was used to describe the growth. It was determined by PCR analysis that pathogens (*OsHV-1*, *Marteilia refringens* and *Perkinsus marinus*) were absent in spat and adult oysters. The temperature influenced the growth and condition when the maximum values were detected in summer. In this period the oysters stop their growth in shell but the available food, indicated by the chlorophyll and seston, allowed the formation of meat. This strategy seems an adaptation of the oysters to the variation of temperature and situates its optimal

development between 20-30 °C. Under these conditions, the model that best described the growth was the Schnute case 1. These results show that in spite of extreme temperatures the oysters showed a good development during cultivation.

Keywords: *Crassostrea gigas*, Pacific oyster, aquaculture, Schnute model, Gulf of California.

INTRODUCCIÓN

Los moluscos son el tercer grupo de interés acuícola en el mundo, solamente superados por los cultivos de peces y de crustáceos; dentro de los moluscos destacan los bivalvos y en particular el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), también conocido como ostión japonés, la cual es la ostra más cultivada en el mundo (FAO, 2018). La especie se distingue por un rápido crecimiento, una amplia tolerancia a diversas condiciones ambientales y buena resistencia contra patógenos, esto ha propiciado que la especie se cultive prácticamente en todos los mares del mundo (Diederich *et al.*, 2005). China es el principal productor mundial de la especie aportando más del 80% de la producción mundial, le siguen Japón, la República de Corea, Francia y Estados Unidos de América (EUA) (FAO, 2016). En este último país, el cultivo del ostión del Pacífico genera 227 millones de dólares al año y más de 15,000 empleos (FAO, 2018).

En México, la especie se introdujo en San Quintín, Baja California, como una alternativa para diversificar la acuicultura en el país (Rosa-Vélez *et al.*, 1991). Los primeros cultivos se realizaron a partir de semilla importada de los EUA y fueron cultivadas en postas rústicas, pero actualmente existen diversos laboratorios de producción de semilla en el noroeste de México (Chávez-Villalba, 2014). En México la tasa de crecimiento para la especie es una de las más rápidas en el mundo, por ejemplo Castillo-Durán *et al.* (2010) mostraron que la especie crece 0.221 mm/día. Se ha reportado que el crecimiento de la especie está relacionado con las variables ambientales, particularmente con la temperatura y la disponibilidad de alimento (Chávez-Villalba *et al.*, 2007).

Las lagunas del Golfo de California presentan una alta variabilidad estacional, atribuida a la escasa precipitación y las altas temperaturas de la región (Arreola-Lizárraga, 2003).

*Autor para correspondencia: José Manuel Grijalva-Chon
 Correo electrónico: manuel.grijalva@unison.mx

Recibido: 18 de septiembre de 2018

Aceptado: 17 de diciembre de 2018

Algunas de estas lagunas son ecosistemas altamente productivos (Gómez-León *et al.*, 2018), particularmente la laguna La Cruz es considerada como una con la mayor productividad primaria del Golfo de California, pero con marcadas variaciones estacionales (Castro-Longoria *et al.*, 1991; Valdez-Holguín *et al.*, 1994; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2013). Aunque se ha evaluado la influencia de las condiciones extremas de temperatura de La Cruz sobre la expresión de genes del ostión del Pacífico (Valenzuela-Castillo *et al.*, 2015), se requiere más información de como esta productividad y variabilidad ambiental influyen en el crecimiento de la especie.

Tradicionalmente el crecimiento es el principal indicador de éxito en los cultivos de los bivalvos y para monitorearlo se emplean mediciones puntuales de la concha (alto, largo y ancho), así como la variación del peso total del organismo en diferentes intervalos de tiempo. No obstante, estas mediciones no permiten identificar patrones de crecimiento, ni identificar la influencia de las variables ambientales sobre el crecimiento de la especie en los cultivos comerciales. Una alternativa a las mediciones tradicionales es la implementación de la inferencia multimodelo, la cual permite identificar el mejor modelo y toma en cuenta variaciones estacionales para describir los patrones de crecimiento de la especie de interés (Chávez-Villalba y Aragón-Noriega, 2015; Góngora-Gómez *et al.*, 2017). Junto con el crecimiento, los índices de condición revelan el estado fisiológico de los organismos cultivados debido a que son afectados por los cambios estacionales de las variables ambientales y por eventos asociados a la reproducción (Gasmi *et al.*, 2017). Los índices brindan además información complementaria de interés a los productores ya que son indicadores de la calidad del producto que será comercializado.

Por otro lado, así como las variables ambientales, los patógenos son un factor limitante en el cultivo del ostión del Pacífico. Por ejemplo, el herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHv-1) y sus variantes, así como los protozoarios *Marteilia refringens* y *Perkinsus marinus* son los principales patógenos que afectan a la especie pudiendo producir altas mortalidades tanto en los cultivos como en los laboratorios de producción de semilla (Vázquez-Yeomans *et al.*, 2004, 2010; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008, 2012; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015; Grijalva-Chon *et al.*, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2017). Estos patógenos están presentes en el Golfo de California y su proliferación está relacionada con las fluctuaciones de las variables ambientales. Las variaciones, particularmente cuando se llega a valores extremos (por ejemplo de temperatura), favorecen el estrés de los organismos en cultivo disminuyendo su capacidad de respuesta a procesos infecciosos (Fuhrmann *et al.*, 2018). El monitoreo continuo de patógenos es fundamental para tratar de mitigar su impacto en los cultivos comerciales.

Como se puede observar, la variabilidad ambiental de las lagunas influye en gran cantidad de procesos que afectan el desarrollo de los organismos, por lo que es importante

documentar su influencia en el crecimiento de especies con interés comercial. Es por ello que el objetivo de este trabajo es analizar la influencia de la variabilidad ambiental de la laguna La Cruz en el crecimiento y la condición del ostión *C. gigas* durante un ciclo de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la compra (siguiendo los protocolos convencionales) de un lote de 10,000 semillas de ostión del Pacífico en un laboratorio proveedor habitual de los ostricultores de la región. El lote se recibió el día 9 de abril del 2014 y se sembró ese mismo día en un sistema tradicional de cultivo en la laguna La Cruz, Sonora (28° 47' 58.0" N, 111° 54' 55.5" W, Fig. 1). El experimento se llevó a cabo del 9 de abril al 12 de diciembre de 2014, y durante este periodo se llevaron a cabo muestreos cada 15 días durante los primeros cinco meses y luego mensualmente hasta el final del estudio.

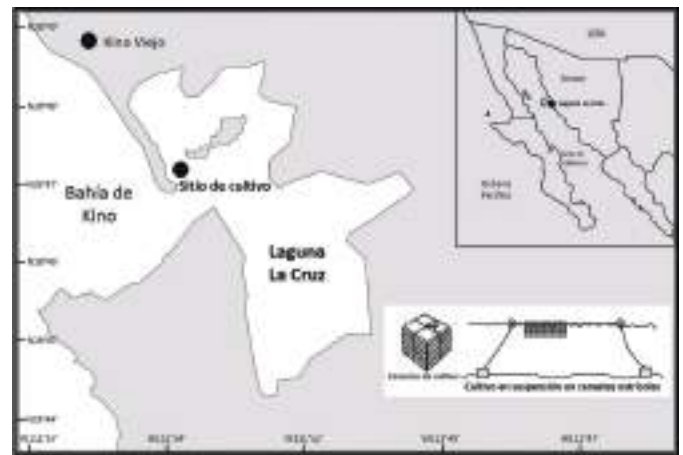


Figura 1. Localización del área de estudio y sistema de cultivo utilizado.
Figure 1. Location of the study area and cultivation system used.

Variables ambientales

La temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto fueron medidos en cada muestreo con una sonda multisensor YSI-85. Al mismo tiempo se colectó una muestra de un litro de agua para estimar la concentración de clorofila *a* y de seston. La concentración de clorofila se determinó mediante la metodología descrita por Parsons *et al.* (1984), mientras que la concentración de seston se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos en Strickland y Parsons (1972).

Crecimiento de los ostiones

Los ostiones se cultivaron usando dos réplicas en un sistema en suspensión en cajas ostrícolas siguiendo los procedimientos (mantenimiento, limpieza, etc.) llevados a cabo por los productores de la región. En cada muestreo se seleccionaron al azar dos grupos (uno por cada réplica) de 50 organismos cada uno y se transportaron en hielo a la Unidad Experimental Kino de la Universidad de Sonora. A los organismos seleccionados se les revisó el estado de las valvas, después se lavaron con agua destilada y en caso de ser necesario se retiraron epibiontes con una espátula. Para

determinar el crecimiento se registró la altura y el largo de la concha con un vernier digital, posteriormente cada ostión fue pesado en una balanza de precisión para obtener su peso total.

Índice de condición

En este trabajo se evaluó el índice de condición considerando que la etapa de semilla corresponde a una altura de concha entre 5 y 10 mm, y la etapa de juvenil y adulto corresponden a alturas mayores de 10 mm. En el caso de las semillas, se utilizó el índice de condición reportado por Barraza-Guardado *et al.* (2009) descrito por la ecuación:

$$IC = \frac{MO}{PS} * 100$$

dónde MO es la materia orgánica y PS es el peso seco. En la etapa de juveniles y adultos el índice de condición fue estimado según lo propuesto por Crosby y Gale (1990) descrito por la ecuación:

$$IC = \frac{PST * 1000}{PSV} * 100$$

dónde PST es el peso seco total y PSV es el peso seco de las valvas.

Modelación del crecimiento individual

Se evaluaron tres modelos de crecimiento y se probaron seis ecuaciones, lo anterior utilizando datos de altura para determinar cuál de los modelos representa mejor los datos. Los modelos utilizados fueron los que se describen a continuación. El modelo de crecimiento de von Bertalanffy descrito por la ecuación:

$$L(t) = L_{\infty} (1 - e^{-k(t-t_0)})$$

El modelo logístico descrito por la ecuación:

$$L(t) = L_{\infty} (1 + e^{-k2(t-t^*)})^{-1}$$

Estos dos modelos utilizan los siguientes parámetros: $L(t)$ es la longitud a la edad t ; t es la edad en años; L_{∞} es la longitud promedio de los organismos más viejos (parámetro de longitud asintótico); k determina la rapidez en que L_{∞} es alcanzada (parámetro de curvatura); t_0 es la edad hipotética en la cual el organismo tiene longitud cero (parámetro de la condición inicial); $k2$ es el parámetro de la tasa de crecimiento relativa; t^* es el punto de inflexión en la curva sigmoidea.

El otro modelo utilizado fue el de crecimiento de Schnute (Schnute, 1981), el cual es un modelo de crecimiento basado en cuatro parámetros que toma cuatro formas matemáticas dependiendo de los valores de a y b en relación a 0. En este estudio se utilizó el modelo Schnute caso 1 cuando $a \neq 0, b \neq 0$, con la ecuación:

$$L_t = \left\{ Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \left[\frac{1 - e^{-a(t-\tau_1)}}{1 - e^{-a(\tau_2-\tau_1)}} \right] \right\}^{\frac{1}{b}}$$

Se utilizó el caso 2 del modelo Schnute cuando $a \neq 0, b = 0$, con la ecuación

$$L_t = Y_1 \exp \left[\ln \left(\frac{Y_2}{Y_1} \right) \frac{1 - e^{-a(t-\tau_1)}}{1 - e^{-a(\tau_2-\tau_1)}} \right]$$

El caso 3 del modelo Schnute fue cuando $a = 0, b \neq 0$, con la ecuación:

$$L_t = \left\{ Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \left[\frac{t - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \right] \right\}^{\frac{1}{b}}$$

En el caso 4 del modelo Schnute fue cuando $a = 0, b = 0$, con la ecuación

$$L_t = Y_1 \exp \left[\ln \left(\frac{Y_2}{Y_1} \right) \frac{t - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \right]$$

Estas ecuaciones utilizan los siguientes parámetros: τ_1 es la menor edad en el set de datos; τ_2 es la mayor edad en el set de datos; a es el parámetro de la tasa de crecimiento relativa; b es la tasa del crecimiento incremental relativo; Y_1 es la talla a la edad τ_1 ; Y_2 es la talla en la edad τ_2 .

Los modelos de Schnute fueron ajustados usando máxima verosimilitud, cuyo algoritmo de ajuste está basado en la ecuación:

$$LL(\Phi|data) = -\left(\frac{n}{2}\right) (\ln(2\pi) + 2 * \ln(\sigma) + 1)$$

dónde Φ representa los parámetros del modelo y σ representa la desviación estándar del error, el cual fue calculado usando la ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\ln L_{obs} - \ln \hat{L})^2}{n}}$$

El enfoque multimodelo se utilizó para determinar el mejor modelo (Katsanevakis, 2006) basado en el criterio AIC (Criterio de Información de Akaike), definido como: $AIC = -2LL + 2\theta_i$ donde LL es el máximo log-likelihood y θ_i es el número de parámetros de cada modelo muestreado. Las diferencias en el AIC ($\Delta_i = AIC_i - AIC_{\min}$), fueron estimadas entre todos los modelos usados en este estudio. El modelo con el menor valor de AIC fue seleccionado como el mejor modelo. Para decidir estadísticamente la aptitud del modelo para describir los datos, se evaluó un criterio propuesto por Burnham y Anderson (2002), en el cual $\Delta_i < 2$ es evidencia de apoyo sustancial, $4 < \Delta_i < 7$ sugiere algo de evidencia y $\Delta_i > 10$ no muestra evidencia esencial en el ajuste de los datos. Finalmente, la plausibilidad de cada modelo fue estimada usando la siguiente fórmula para el peso de Akaike:

$$W_i = \frac{e(-0.5\Delta_i)}{\sum_{k=1}^4 e(-0.5\Delta_k)}$$

Análisis de patógenos

Para el análisis de patógenos se tomaron 100 semillas antes de la siembra y 30 ostiones adultos al final del período de cultivo. Todas las muestras se conservaron en etanol ($\geq 95\%$). En el caso de la semilla, estos se agruparon en lotes de cinco organismos (incluido el caparazón) para obtener un total de 20 lotes. Los procedimientos para detectar los patógenos fueron los mismos para semillas y adultos utilizando métodos reportados en la literatura. Para *OshV-1* se basó en Arzul *et al.* (2014) y las condiciones de amplificación fueron las descritas por Renault *et al.* (2000) y Vigneron *et al.* (2000). Para *Perkinsus marinus* se usó lo reportado por Casas *et al.* (2002) y Audemard *et al.* (2004), con las condiciones de amplificación informadas por Enríquez-Espinoza *et al.* (2010). Finalmente, para *Marteilia refringens* se realizó una PCR anidada con oligos reportados por López-Flores *et al.* (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables ambientales

La temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en el sitio de estudio presentaron variaciones estacionales durante el cultivo experimental (Fig. 2a). La temperatura promedio fue de 28.4 ± 4.5 °C, con valores máximos en agosto (33 °C) y mínimos en diciembre (19.1 °C). El promedio de salinidad fue de 37.7 ± 1.4 y los valores mostraron un patrón descendente de

abril (40) a septiembre (35.2), para luego volver a incrementar hasta el final del estudio (37.5). El promedio de oxígeno fue de 6.4 ± 0.8 mg L⁻¹ con oscilación de sus valores entre 5.5 – 7 mg L⁻¹ y con un valor máximo de 8.6 mg L⁻¹ en diciembre. La temperatura y la concentración de oxígeno presentaron patrones inversos. Los valores mayores de temperatura coincidieron con las menores concentraciones de oxígeno, lo cual es común en las lagunas costeras del Golfo de California (Valdez-Holguín *et al.*, 1994; Páez-Osuna *et al.*, 2016). Por otro lado, todos los registros de salinidad fueron mayores de 35, lo que indicó condiciones hipersalinas (Fig. 2a). Se ha reportado altas salinidades en las lagunas del noroeste de México debido a la alta tasa de evaporación (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Páez-Osuna *et al.*, 2016), lo cual está asociado a la profundidad y la tasa de renovación del agua en las lagunas (Bonilla *et al.*, 2005; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005).

La concentración de clorofila *a* mostró variaciones durante el cultivo experimental con dos picos principales, el mayor en junio (6.5 µg L⁻¹) y otro en septiembre (5.9 µg L⁻¹) (Fig. 2b). Este comportamiento es común en lagunas costeras subtropicales y son atribuidos principalmente a los eventos de surgencias marinas (Lara-Rodríguez *et al.*, 2015). La concentración de clorofila *a* durante el cultivo experimental no parece haber sido influenciada por algún otro parámetro del agua. Por otra parte, el seston presentó dos picos, el mayor en mayo (10.3 mg L⁻¹) con un descenso marcado en junio (5.2 mg L⁻¹), y luego otro en julio (8.9 mg L⁻¹) con descenso continuo hasta el final del estudio (Fig. 2b). No se observó correlación del seston con la clorofila, como ha sido reportado por Cervantes-Duarte *et al.* (2017) en la bahía de La Paz, Baja California Sur, que se encuentra también en el Golfo de California. El seston en la laguna La Cruz podría estar relacionado con los aportes de agua de las granjas camaronícolas y de los asentamientos humanos de Kino Viejo y Kino Nuevo hacia este cuerpo de agua. Lo anterior debido a que el seston se relaciona con aportes antropogénicos (Souchu *et al.*, 2010). En general, las variaciones estacionales, así como los valores de las variables ambientales del agua observados en este estudio coinciden con lo encontrado en reportes anteriores para este cuerpo de agua (Castro-Longoria *et al.*, 1991; Valdez-Holguín, 1994; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2013). Con esto se demuestra que las condiciones ambientales no han presentado cambios significativos en los últimos años.

Desde el punto de vista acuícola, las concentraciones de clorofila *a* y de seston evidenciaron la disponibilidad de alimento para el ostión cultivado. Por ejemplo, se reportó por Lodeiros *et al.* (2018) un crecimiento óptimo de *C. gigas* alcanzando la talla comercial en menos de un año bajo concentraciones de seston (2.5 -14.5 mg L⁻¹) similares a las de este estudio.

Crecimiento y condición

La talla promedio de altura de la concha durante la siembra fue de 4.2 ± 0.6 mm; posteriormente el crecimiento de los ostiones fue sostenido alcanzando un promedio de 57.7 ± 7.3 mm en junio (Fig. 3a). Después el crecimiento

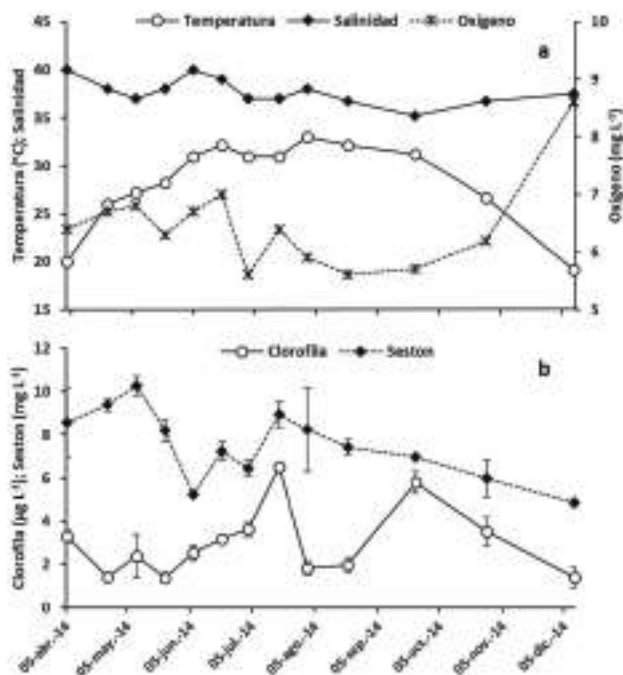


Figura 2. Valores de temperatura, salinidad y oxígeno (a) y de clorofila *a* y seston (b) registrados en la laguna La Cruz, Sonora.
Figure 2. Values of temperature, salinity and oxygen (a), and chlorophyll *a* and seston (b) registered at La Cruz lagoon, Sonora.

prácticamente se detiene de julio a octubre, pero se reactiva durante diciembre alcanzando 74.5 ± 7.95 mm al final del experimento. Se observó el mismo patrón para la longitud de la concha, iniciando con una talla 1.8 ± 0.78 mm para la siembra y posteriormente con crecimiento continuo hasta junio (32.9 ± 3.6 mm) (Fig. 3a). El crecimiento se mantiene relativamente constante de julio a octubre y se reactiva en diciembre alcanzando 45.3 ± 5.07 mm al final del cultivo. La sobrevivencia al término del cultivo experimental fue de 92.3% y la tasa promedio de crecimiento diaria se estimó en 0.292 mm/día (altura de concha).

Los resultados indicaron que el crecimiento de los

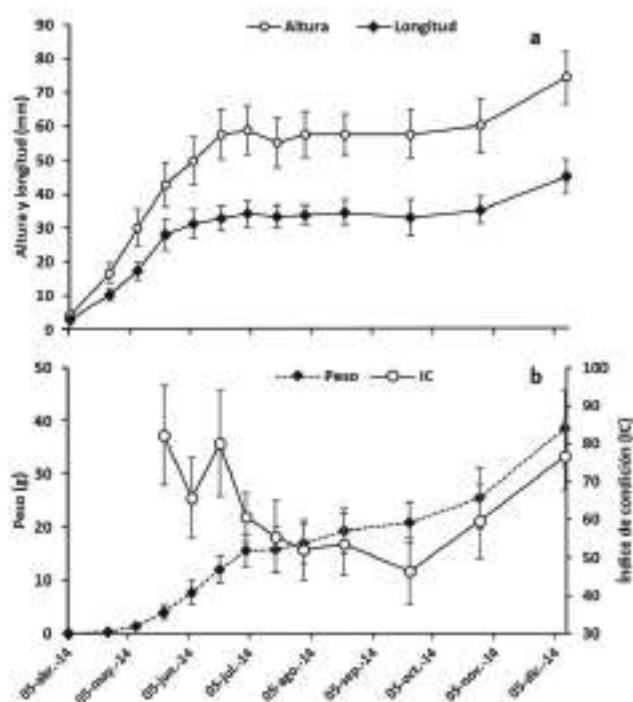


Figura 3. Variación de altura y longitud promedios (a) y de peso e índice de condición promedios (b) de ostiones *Crassostrea gigas* cultivados en la laguna La Cruz, Sonora.

Figure 3. Mean height and length variation (a), and mean weight and condition index variation (b) of oysters *Crassostrea gigas* cultivated at La Cruz lagoon, Sonora.

ostiones cultivados estuvo fuertemente influenciado por la temperatura del agua. La relación entre temperatura y crecimiento ha sido reportada para el ostión del Pacífico en México y otros países del mundo (Castillo-Durán *et al.*, 2010; Gamain *et al.*, 2017; Góngora-Gómez *et al.*, 2017; Lodeiros *et al.*, 2018). En otras regiones, las temperaturas mayores a 20 °C se consideran no óptimas para el desarrollo de *C. gigas* (Samain *et al.*, 2005). No obstante, en este estudio la temperatura durante la siembra fue de 20 °C y luego aumentó gradualmente permitiendo un crecimiento sostenido de los organismos hasta junio cuando la temperatura llegó hasta 32.2 °C. Durante ese periodo la clorofila mantuvo valores promedio de $2.4 \pm 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ y se detectó el pico más importante de seston, sugiriendo que los ostiones tuvieron buena disponibilidad de alimento

para soportar el crecimiento. No obstante, aún con abundante alimento disponible (picos de clorofila y seston) de julio a octubre, el efecto de temperaturas mayores a 30 °C durante este periodo detuvo el crecimiento de los organismos. Este comportamiento coincide con resultados anteriores donde el crecimiento de *C. gigas* se frena significativamente cuando se presentan las temperaturas máximas (Chávez-Villalba *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que en las lagunas del Golfo de California el rango óptimo para el desarrollo de la especie parece estar entre 20-30 °C debido a décadas de adaptación a las condiciones locales.

El peso promedio de las semillas durante la siembra fue de 0.1 mg, luego la ganancia en peso es continua hasta julio alcanzando 15.6 ± 3.1 g (Fig. 3b). Posteriormente, la ganancia en peso sigue aumentando, pero a una tasa menor hasta octubre (25.5 ± 5.6 g), para incrementar nuevamente y alcanzar 38.6 ± 7.2 g al final del estudio. Como se ha mencionado anteriormente, la disponibilidad de alimento durante el periodo de cultivo fue buena, no presentando restricciones para el adecuado desarrollo de los organismos. Por lo tanto, la disminución de ganancia en peso durante verano también se puede atribuir al efecto de las temperaturas más altas. Pero a diferencia de la concha, el peso total de los ostiones no se detiene sino que sólo disminuye, lo que sugiere que lo que sigue aumentando es el peso de la carne. El desacoplamiento entre el crecimiento de la concha y los tejidos ya se había reportado para la especie, pero en la mayoría de los casos ocurre que la concha sigue creciendo mientras que la ganancia en peso se retarda debido a poca disponibilidad de alimento (Brown y Hartwick, 1988). Este patrón también se detectó en ostiones cultivados dentro de la laguna La Cruz cuando se compararon con ostiones cultivados fuera de ésta (Chávez-Villalba *et al.*, 2010). La diferencia observada en este estudio es que, debido a la disponibilidad de alimento, los ostiones canalizaron la energía para formar tejido en lugar de producir concha. Esto también es un indicador de la adaptación de la especie a las condiciones ambientales locales y refleja una ventaja para los ostricultores, ya que los ostiones, aunque dejan de crecer no se “adelgazan” en verano y conservan buenas propiedades para su futura comercialización. Esta estrategia parece surgir después de años de adaptación de los ostiones, ya que aunque la especie tiene su origen natural en aguas templadas, su naturaleza euritérmica y eurihalina (Chávez-Villalba, 2014) le han permitido sobrevivir en las condiciones extremas de las lagunas del Golfo de California. Esta adaptación podría haber favorecido otros procesos como el de fijación de semilla en las lagunas, pero esto tiene que comprobarse en estudios futuros.

El índice de condición (IC) inició con valores altos (82.2 máximo) en mayo y junio para posteriormente disminuir gradualmente y llegar al valor más bajo en septiembre (46.4). Después vuelve a aumentar durante octubre y diciembre hasta alcanzar un valor de 76.8 al final del estudio (Fig. 3b). En general, el IC fue bueno durante todo el experimento debido a que los valores siempre permanecieron por arriba de 50 (excepto septiembre) con un promedio final de $63.2 \pm$

12.5. La disminución del IC también correspondió al período de temperaturas altas y reducción de la tasa de ganancia en peso indicando que el verano-otoño es una fase crítica para los ostiones.

El patrón del IC observado aquí es diferente al reportado por Chávez-Villalba *et al.* (2010) para *C. gigas* en esta misma laguna, estos autores encontraron valores más bajos, poca variación y no detectaron picos significativos. No obstante, el patrón es similar al descrito por Chávez-Villalba *et al.* (2007) en la laguna El Soldado, Sonora, también para el ostión del Pacífico, y esos autores no detectaron desoves ni cambios significativos del IC durante la época reproductiva. Se ha descrito que los eventos reproductivos alteran la condición fisiológica de la especie, lo que se ve reflejado en el índice de condición (Suquet *et al.*, 2016). Aquí observamos una disminución significativa del IC durante la época que correspondería a la reproducción de la especie en Bahía Falsa, Baja California (Cáceres-Martínez *et al.*, 2004). No obstante, no tenemos elementos para confirmar que la disminución del IC corresponda a un desove porque no se hicieron análisis histológicos y porque en el momento del evento los ostiones todavía se consideraban juveniles (3-4 meses de edad). Es necesario volver a hacer estudios sobre *C. gigas* en esta laguna para saber si debido a procesos de adaptación, el desarrollo de la reproducción ha cambiado y ahora sea posible que los ostiones desoven y existan fijaciones de semilla. A la fecha, en México no se tienen registros de fijaciones de semilla de la especie en los sitios de cultivo ni en otras áreas (Chávez-Villalba, 2014).

Modelo de crecimiento

En base al criterio de información de Akaike (AIC_c), el modelo que mejor describió el crecimiento de *C. gigas* en este estudio fue el Schnute caso 1, con una plausibilidad del 100% y con la siguiente ecuación:

$$L_t = \left\{ 4.1^{-0.5} + (59.4^{-0.5} - 4.1^{-0.5}) \left[\frac{1 - e^{-20.4(t-0.11)}}{1 - e^{-20.4(0.79-0.11)}} \right] \right\}^{-0.5}$$

En general, todos los modelos probados presentaron un buen ajuste a los datos, reflejando la viabilidad de implementar la inferencia multimodelo (IMM) como una alternativa para seleccionar el modelo que mejor describa el crecimiento de la especie. Tradicionalmente, el crecimiento de los bivalvos se modela en base al modelo de von Bertalanffy, sin embargo, se ha cuestionado si realmente es el mejor modelo para este grupo de animales (Cruz-Vázquez *et al.*, 2012). En México se ha modelado el crecimiento de algunos bivalvos usando la IMM, por ejemplo, Góngora-Gómez *et al.* (2017) compararon los modelos de von Bertalanffy y von Bertalanffy estacional encontrando que el segundo describe mejor el crecimiento de *C. gigas*. Por otro lado, Chávez-Villalba y Aragón-Noriega (2015) compararon seis modelos de crecimiento concluyendo que el modelo Schnute caso 3 es el que mejor modela el crecimiento de *C. corteziensis*. Esto coincide con lo reportado para *C. gigas* en Argelia, donde se

encontró, a través de la IMM, que el modelo Schnute 3 fue el mejor para la especie (Haoui-Meslem *et al.*, 2017). Como se puede apreciar, el crecimiento de la especie y de los bivalvos en general puede ser muy variable dependiendo de las condiciones ambientales donde se desarrollen, por lo que se requiere técnicas como la IMM para encontrar el modelo que mejor describa el crecimiento. No obstante, no se descarta la idea de encontrar un modelo universal para describir el crecimiento de los bivalvos, pero se requieren de más estudios en esta disciplina.

Patógenos

Los resultados de los análisis de patógenos indicaron que no se registró presencia de OsHV-1, *Marteilia refringens* y *Perkinsus marinus*, ni en semilla antes de la siembra ni en adultos al final del cultivo. Estos patógenos han sido reportados en las lagunas del Golfo de California causando mortalidades tanto en los laboratorios de producción como en los cultivos comerciales (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Grijalva-Chon *et al.*, 2013, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2017). Desde la perspectiva de la sanidad acuícola se puede asumir que los protocolos para prevenir los patógenos en los laboratorios de producción de semilla están dando buenos resultados. Por otra parte, si se considera las variaciones ambientales en el sitio de cultivo y la relación de éstas con la proliferación de patógenos (Solomieu *et al.*, 2015), podemos afirmar que el lote de semillas utilizado en este estudio presenta buena resistencia a enfermedades.

CONCLUSIONES

La temperatura del agua influyó directamente en el crecimiento y la condición de los ostiones durante su cultivo. Durante los periodos más elevados de temperatura, los ostiones parecen adoptar una estrategia que les permite frenar el crecimiento de la concha y usar la energía proveniente del alimento para formar carne. El estrés que pudiera provocar los cambios extremos de los parámetros del agua no se vio reflejado en infecciones por patógenos a pesar de los múltiples reportes de patógenos asociados a bivalvos en La Cruz. Esto es un indicador de cultivos sanos, lo que contribuye a fortalecer la ostricultura de la región. Desde el punto de vista de la acuicultura, los resultados obtenidos indican un buen desarrollo de los ostiones en cultivo, los cuales están dentro de los estándares de los cultivos comerciales en México. Los modelos de crecimiento fueron sensibles a las variaciones ambientales y su influencia en el crecimiento de los ostiones. Esto indica la importancia de emplear técnicas como la inferencia multimodelo para describir más fielmente el crecimiento de los bivalvos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo técnico de Andrés Hernández-Ibarra y Josué Valenzuela-Díaz (CIBNOR Unidad Guaymas), Martín Acedo-Valdez (UNISON), Francisco Hoyos-Chairez y

Víctor Vera-López (CREMES). Este proyecto fue realizado con apoyo de la Fundación Produce Sonora (proyecto 898-1). El primer autor recibió una beca doctoral por parte del CONACYT.

REFERENCIAS

- Álvarez-Borrego, S. y Lara-Lara, J.R. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. En: *The Gulf and Peninsular Province of the Californias*. J.P. Dauphin y B. Simoneit (ed.), pp 555-567. American Association of Petroleum Geologist, Tulsa.
- Arreola Lizárraga, J.A. 2003. Bases de manejo costero: Patrones ecológicos en la laguna costera Las Guásimas Territorio Yaqui, México. Tesis Doctoral. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz B.C.S. México.
- Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J., Baldi, Y., Robert, M., Joly, J.P., Garcia, C. y Bouchoucha, M. 2014. Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*. 141: 227-240.
- Audemard, C., Reece, K.S. y Bureson E.M. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 6611-6618.
- Barraza-Guardado, R.H., Chávez-Villalba, J., Atilano-Silva, H. y Hoyoz-Chairez, F. 2009. Seasonal variation in the condition index of Pacific oyster postlarvae (*Crassostrea gigas*) in a land-based nursery in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*. 40: 118-128.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L. y Pérez, M.C. 2005. Influence of hydrology on phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries*. 28: 884-895.
- Brown, J.R. y Hartwick, E.B. 1988. Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Absolute and allometric growth. *Aquaculture*. 70: 231-251.
- Burnham, K.P. y Anderson, D.R. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2th ed. Springer Science & Business Media. New York.
- Cáceres-Martínez, J., Ramírez-Gutiérrez, S., Vázquez-Yeomans, R. y Macías-Montes de Oca, P. 2004. Reproductive cycle and mortality of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 3: 795-801.
- Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G. y Portilla, M.R. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99: 66-73.
- Cáceres-Martínez, J., García-Ortega, M., Vázquez-Yeomans, R., Pineda-García, T.J., Stokes, N.A. y Carnegie, R.B. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110: 321-325.
- Casas, S.M., La Peyre, J.F., Reece, K.S., Azevedo, C. y Villalba, A. 2002. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 52: 217-231.
- Castillo-Durán, A., Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A. y Barraza-Guardado, R. 2010. Crecimiento comparativo, condición y supervivencia de juveniles de los ostiones *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* cultivados en verano e invierno. *Ciencias Marinas*. 36: 29-39.
- Castro-Longoria, R. y Grijalva-Chon, J.M. 1991. Variabilidad espacio-temporal de nutrientes y seston en la laguna costera La Cruz, Sonora. *Ciencias Marinas*. 17: 83-97.
- Cervantes-Duarte, R., Rodríguez-Mata, L.M. y López-López, S. 2017. Efecto de la marea en la concentración de nutrientes, clorofila *a* y parámetros físicos y químicos en una laguna costera subtropical (Bahía Magdalena, México). *Hidrobiológica*. 27: 253-264.
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, F. y Cáceres-Martínez, C. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*. 38: 268-278.
- Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A., Burrola-Sánchez, S. y Hoyos-Chairez, F. 2010. Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture*. 300: 128-136.
- Chávez-Villalba, J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*. 24: 175-190.
- Chávez-Villalba, J. y Aragón-Noriega, E. 2015. Modeling the individual growth of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae) from central Gulf of California. *Cahiers de Biologie Marine*. 56: 231-236.
- Crosby, M.P. y Gale, L.D. 1990. A review and evaluation on bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*. 9: 233-237.
- Cruz-Vásquez, R., Rodríguez-Domínguez, G., Alcántara-Razo, E. y Aragón-Noriega, E.A., 2012. Estimation of individual growth parameters of the Cortez geoduck *Panopea globosa* from the central Gulf of California using a multimodel approach. *Journal of Shellfish Research*. 31: 725-732.
- De la Re-Vega, E., Sánchez-Paz, A., Gallardo-Ybarra, C., Lastra-Encinas, M.A., Castro-Longoria, R., Grijalva-Chon, J.M., López-Torres, M.A. y Maldonado-Arce, A.D. 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish and Shellfish Immunology*. 71: 127-135.
- Diederich, S., Nehls, G., van Beusekom, J.E.E. y Reise, K. 2005. Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? *Helgoland Marine Research*. 59: 97-106.
- Enríquez-Espinoza, T., Grijalva-Chon, J., Castro-Longoria, R. y Ramos-Paredes, J. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*. 89: 269-273.
- Enríquez-Espinoza, T.L., Castro-Longoria, R., Mendoza-Cano, F. y Grijalva-Chon, J.M. 2015. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, México. *Biotecnia*, 17: 10-13.
- Escobedo-Fregoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J.N., Llera-Herrera, R. y Vázquez-Juárez, R. 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the Atlantic coast. *Transboundary and Emerging Diseases*. 62: 137-147.
- FAO. 2016. Cultured Aquatic Species Information Program *Crassostrea gigas*. FAO, Roma. [Consultado 17 de enero 2018]. Disponible en http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/USA/en.

- FAO 2005-2018. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. Programa de información de especies acuáticas. FAO, Roma. [Consultado 17 enero 2018]. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es.
- Fuhrmann, M., Delisle, L., Petton, B., Corporeau, C. y Pernet, F. 2018. Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biology Open*. 7: bio028134.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y. y Morin, B. 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryonal development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Pollution Bulletin*. 115: 201-210.
- Gárate-Lizárraga, I., Poot-Delgado, C.A., Ramírez-Castillo, E.R. y Páez-Hernández, M.H. 2013. Proliferación de *Pseudo-nitzschia brasiliensis* y *P. cf. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) en el Estero Santa Cruz, norte del Golfo de California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 48: 393-399.
- Gasmi, S., Bernard, I., Pouvreau, S., Maurer, D., Schaal, G., Ganthy, F., Cominassi, L., Allain, G., Sautour B. y David, V. 2017. Spatial patterns in the condition index of the wild Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a macrotidal coastal ecosystem: Influence of tidal processes and beyond. *Journal of Sea Research*. 119: 28-36.
- Gómez-León, A., Rodríguez-Figueroa, G.M., Shumilin, E., Carreño, A.L. y Sánchez, A. 2018. Abundance and distribution of benthic foraminifera as indicators of the quality of the sedimentary environment in a subtropical lagoon, Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. 130: 31-39.
- Góngora-Gómez, A.M., Aragón-Noriega, E.A., Domínguez-Orozco, A.L. y Villanueva-Fonseca, B.P. 2017. Modeling the individual growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated in the Gulf of California using the von Bertalanffy model. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 52: 181-185.
- Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J., Enríquez-Espinoza, T.L. y Mendoza-Cano, F. 2013. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from the Gulf of California. *Journal of Fish Diseases*. 36: 965-968.
- Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enríquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martínez, A.N. y Mendoza-Cano, F. 2015. Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 43: 776-780.
- Haoui-Meslem, N., Chávez-Villalba, J., Alcántara-Razo, E. y Rebzani-Zahaf, C. 2017. Growth, condition and gametogenic activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Algeria. *Cahiers de Biologie Marine*. 58: 153-161.
- Katsanevakis, S. 2006. Modelling fish growth: model selection, multi-model inference and model selection uncertainty. *Fisheries Research*. 81: 229-235.
- Lara-Rodríguez, R., Velásquez-Arenas, R., Troccoli-Ghinaglia, L., Hernandez, D. y Lemus, M. 2015. Variación temporal de las variables físico-químicas y biomasa fitoplanctónica en aguas superficiales de la zona costera de Chacopata, NE Venezuela (Mar Caribe). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 50: 367-373.
- Lodeiros, C., Rodríguez-Pesantes, D., Márquez, A., Revilla, J., Chávez-Villalba, J. y Sonnenholzner, S. 2018. Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Eastern Tropical Pacific. *Aquaculture International*. 26: 337-347.
- López-Flores, I., De La Herrán, R., Garrido-Ramos, M.A., Navas, J.I., Ruíz-Rejón, C. y Ruíz-Rejón, M. 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA igs sequence. *Parasitology*. 129: 411-419.
- Martínez-García, M.F., Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Chávez-Villalba, J.E., Enríquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martínez, A.N. y Peña-Messina, E. 2017. OsHV-1 and notifiable protozoa in healthy *Crassostrea corteziensis* cultured in two distant areas of the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 45: 699-707.
- Páez-Osuna, F., Sanchez-Cabeza, J., Ruiz-Fernández, A., Alonso-Rodríguez, R., Piñón-Gimate, A., Cardoso-Mohedano, J., Flores-Verdugo, F., Carballo, J., Cisneros-Mata, M. y Álvarez-Borrego, S. 2016. Environmental status of the Gulf of California: A review of responses to climate change and climate variability. *Earth Science Review*. 162: 253-268.
- Parsons, T. R., Maitia, Y. y Lalli, C.M. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Sea Water Analysis*. 1st ed. Pergamonn Press, Oxford.
- Pérez-Ruzafa, A., Fernández, A.I., Marcos, C., Gilabert, J., Quispe, J.I. y García-Charton, J.A. 2005. Spatial and temporal variations of hydrological conditions, nutrients and chlorophyll a in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, Spain). *Hydrobiologia*. 550: 11-27.
- Renault, T., Le Deuff, Chollet B., Cochenne, N. y Gerard, A. 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42: 173-183.
- Rosa-Vélez J., Gutiérrez-Wing, M.T. y Radilla-Camacho, R., 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, B.C., México: Aspectos genéticos. *Ciencias Marinas*. 17: 133-145.
- Samain, J.F., Boudry, P., Dégremont, L., Soletchnik, P., Ropert, M., Bédier, E., Martin, J.L., Moal, J., Mathieu, M., Pouvreau, S., Lambert, C., Escoubas, J.M., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Burgeot, T. y Bacher, C. 2005. Information on the Distribution, Causes and Significance of the Summer Mortality Syndrome in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and Other Bivalve Species. Report on the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms, ICES CM 2005/F:02, 8-12 March, La Tremblade, France.
- Schnute, J. 1981. A versatile growth model with statistically stable parameters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 38: 1128-1140.
- Souchu, P., Bec, B., Smith, V. H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Yves, C. y Vaquer, A. 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll *a* along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 67: 743-753.
- Strickland, J.D.H. y Parsons, T.R. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin no. 67. Ottawa Canada.
- Solomieu, V.B., Renault, T. y Travers, M.A. 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 131: 2-10.

- Suquet, M., Malo, F., Quere, C., Ledu, C., Le Grand, J. y Benabdelmouna, A. 2016. Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 451: 11-15.
- Valdez-Holguín, J.E. 1994. Variaciones diarias de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y clorofila a, en una laguna hipersalina del Golfo de California. *Ciencias Marinas*. 20: 123:137.
- Valenzuela-Castillo, A., Sánchez-Paz, A., Castro-Longoria, R., López-Torres, M.A. y Grijalva-Chon, J.M. 2015. Seasonal changes in gene expression and polymorphism of hsp70 in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. *Marine and Environmental Research*. 110: 25-32.
- Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J. y Huerta, A.F. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 23: 417-419.
- Vignerón, V., Sollic, G., Montanié, H. y Renault, T. 2004. Detection of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: Influence of water parameters in bioassays. *Diseases Aquatic Organism*. 62: 35-44.
- Villanueva-Fonseca, L.C. y Escobedo-Bonilla, C.M. 2013. Prevalencia del protozoario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41: 996-1002.



Multi-model inference as criterion to determine differences in growth patterns of distinct *Crassostrea gigas* stocks

F. J. Reynaga-Franco¹ · E. A. Aragón-Noriega² · J. M. Grijalva-Chon¹ · R. Castro-Longoria¹ · J. A. Arreola-Lizárraga² · R. H. Barraza-Guardado¹ · J. Chávez-Villalba²

Received: 17 July 2018 / Accepted: 9 May 2019 / Published online: 20 May 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Production of *Crassostrea gigas* in hatcheries may be affected by different factors influencing spat quality; this will be reflected during its cultivation in the field. The main indicator of quality is growth. Growth modeling is a form of determining individual growth patterns in bivalves. In this study, multi-model inference (MMI) and the Akaike information criterion (AIC) were employed to identify differences in growth patterns of distinct *C. gigas* stocks. The experiment used spat produced in four different hatcheries (A, B, C, and D), which were cultivated under identical conditions. The stocks showed similar growth patterns but the best growth models to describe every case were different; hatchery A—von Bertalanffy (AIC = -15.27), hatchery B—Schnute model case 3 (AIC = -0.46), and hatcheries C and D—Schnute model case 1 (AIC = 233.4 and -73.3, respectively). According to the models, oysters from hatchery B did not reach their maximum growth while the rest did it. Differences may be attributed to stock origin while the spat quality seems associated with production protocols. Results showed that growth patterns of *C. gigas* can be variable under the same cultivation conditions but the differences are difficult to detect. We demonstrated that the only way to find such differences was via MMI, and this approach should be used for any aquaculture resource.

Keywords Akaike information criterion · Epigenetics · Hatchery · Oyster culture · Spat · Temperature

✉ J. Chávez-Villalba
jechavez04@cibnor.mx

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Av. Luis D. Colosio s/n, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Sonora, Apdo. Postal 349, 85454 Guaymas, Sonora, Mexico

Introduction

The Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) is the bivalve mollusk mostly cultivated of the world; it is present in practically all the seas and represents the highest values of shellfish aquaculture (FAO 2005–2018). The species has been introduced in more than 60 countries and in many of them are currently cultivated as non-native species (Diederich et al. 2005; Miossec et al. 2009). Commercial aquaculture of *C. gigas* is based on spat availability, which are juveniles showing a 0.5–35-mm shell length. The spat is obtained from the wild through collectors placed in lagoons and estuaries during the reproductive season of the species (Robert and Gérard 1999) or can be artificially produced in hatcheries (Guo et al. 1999; Corporeau et al. 2012).

Obtaining spat implies certain difficulties; for example, in some regions, natural spat collection is not possible, has decreased, or presents variability of natural spat recruitment on a yearly basis (Buestel et al. 2009; Neto et al. 2013). Hatcheries emerged as an alternative to address previous problems (Frias and Segovia 2010), and in some cases, oyster farming totally relies on hatchery-produced spat (Chávez-Villalba 2014). Nevertheless, hatcheries are affected by a large number of factors, among the most relevant are the seawater quality (pH, CO₂) (Barton et al. 2015), the low quality of microalgal cultures (Helm et al. 2004), diseases associated to pathogens (bacteria, virus) causing elevated mortalities during larvae and spat production (Friedman et al. 2005; Burge et al. 2007), and reduced genetic variability of breeding oysters (Dégremont et al. 2015). All these elements can act at the same time or only one of them at a time, but generally produce significant variations in the quality of gametes and larvae, which invariably affect the spat quality.

Usually, juvenile performances during its field cultivation are related to spat quality and the main indicator of this is growth. Either in natural populations or in commercial oyster farming, growth can be measured using the shell length increase (or height) and the weight variation (total or tissue) at different time intervals (Dridi et al. 2007), concomitantly associated to condition index estimates (Barraza-Guardado et al. 2009). Pacific oyster growth is linked to environmental variables like temperature and primary productivity since it feeds mainly on phytoplankton (Mondol et al. 2016; Gasmi et al. 2017). In a previous study, we demonstrated the importance of such variables in this species, the temperature as a governing factor influencing growth rates, and the food supply as a regulator of condition index (Reynaga-Franco et al. 2019).

The model traditionally used to determine growth in different species is that of von Bertalanffy (VBGM) (Zhu et al. 2009). Nevertheless, it has been reported that the VBGM cannot be adjusted to all types of data sets, therefore representing an issue for certain bivalve species of commercial interest (Cruz-Vásquez et al. 2012). In that sense, it is possible to use other growth models like that of Gompertz (1825), the logistic (Ricker 1975), and the Schnute (1981).

When using different models to determine growth patterns in cultivated organisms, it is important to consider that growth can be asymptotic or undetermined. The latter occurs when the individual growth curve of harvested animals is still in the exponential phase. The asymptotic growth has two shapes, inverted exponential or sigmoidal (S shape). The specialized VBGM describes an inverted exponential growth curve, while the logistic function (Ricker 1975) is a very common but also very basic form of a sigmoid function. Due to its simplicity, it has been applied widely but is limited by its mathematical background. Originally, the function was developed to study population growth but was later applied to individual growth studies.

Due to its simple formulation, the inflection point of the curve is always set in the middle; both sides are inverted mirror images. The logistic curve is always symmetric. Similar to the logistic function, the Gompertz function is a sigmoid-shaped function and, in comparison with the previous one, is an asymmetric curve with the inflection point not set in the middle of the curve. All these previous models contain three parameters to describe the shape of the curve. One of the parameters is the asymptote, which is unrealistic for indeterminate growth. An alternative is the versatile growth model proposed by Schnute (1981) which can represent eight curves depending on the values of two parameters named “a” and “b.” With the Schnute model, both the asymptotic and indeterminate growth can be expressed.

When more than one model is used to determine growth, it is necessary to choose the best model. This can be performed using information theory, which is an approach that has been recommended as a more robust alternative compared with traditional methods (Katsanevakis 2006). The most common information theory approach is the Akaike information criterion (AIC) that has been used in other growth studies in bivalve mollusks (Cruz-Vásquez et al. 2012; Aragón-Noriega 2013; Chávez-Villalba and Aragón-Noriega 2015). In this context, this study aims to use the multi-model inference and information theory to determine the individual growth patterns of *C. gigas* from various hatcheries, but cultivated under similar environmental conditions. Environmental variables, reproduction, spat size, stocks’ origin, hatchery infrastructure, mortality, genetics, and epigenetics effects are discussed.

Material and methods

Crassostrea gigas stocks

The oyster spat for cultivation and production of *C. gigas* in Mexico is obtained from national hatcheries or is imported from other countries (mainly USA). Usually, the annual cycle for spat production lasts from February to June. In 2014, four hatcheries located in northwestern Mexico with the highest commercial activity and named anonymously hatcheries A, B, C, and D were selected for the experiment (Fig. 1). Background information on broodstock used for spat production in every hatchery was requested. A common element is that the original broodstocks for hatcheries A, B, and D were imported from the USA. Currently, hatchery A uses local oysters chosen from internal selection programs, hatchery B employs local oysters but they are used to exchange broodstock with other local hatcheries, hatchery C production is based upon oysters coming from selective breeding programs but improved traits were unknown, and hatchery D uses local oysters produced from their own farm. Then, a batch of spat from each hatchery was purchased with the request size between 3 and 4 mm (shell length), which is the most demanded size by the local oyster farmers. Disease-free certificate of oysters was also requested.

Cultivation and sampling

Every hatchery sent a lot of 10,000 juveniles (spat) to the city of Hermosillo (Sonora) then the lots were transported to a laboratory (University of Sonora, Kino Experimental Unit) for a general inspection and obtaining samples of each lot to measure the average shell length to the nearest 0.01 mm using an electronic vernier caliper and to determine the average weight to the nearest 0.001 g with a precision balance (Denver instrument M120, NY, USA). Nevertheless,

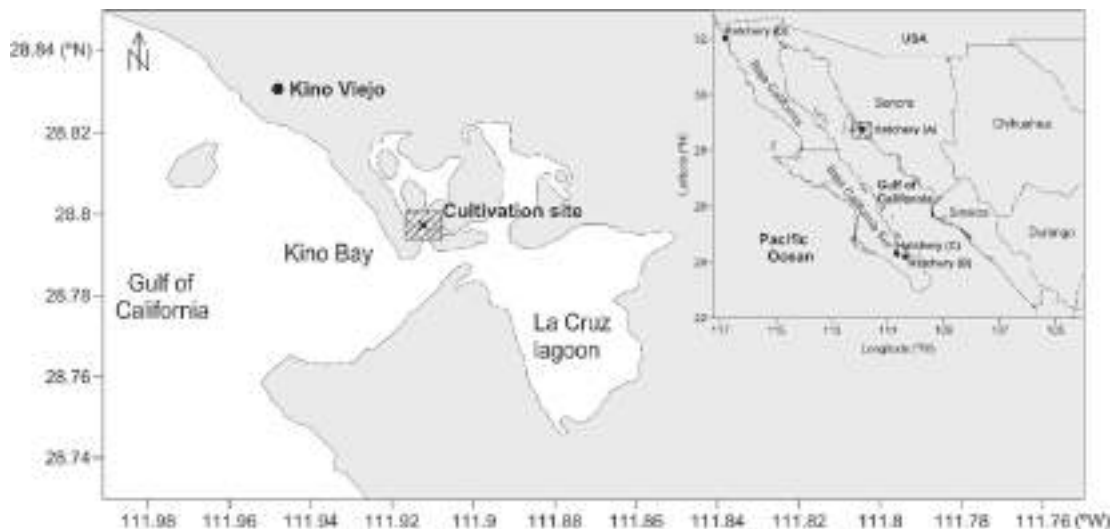


Fig. 1 Experimental cultivation site and location of hatcheries producing *Crassostrea gigas* spat selected for the study

none of the hatchery sent the requested spat size, all being out of range. Although spat selection is based on a sieving process, we do not have information if the spat was selected from a particular quartile of the size distribution or what was the procedure that was followed. The initial spat size ranged from 4.2 ± 0.5 mm to 6.3 ± 1.6 , 2.3 ± 0.3 , and 5.1 ± 0.7 for A, B, C, and D, respectively.

Spat batches were deployed in Nestier® plastic trays forming cultivation modules; two replicated modules were formed for every lot and were tied to a long-line system located in La Cruz lagoon, Sonora ($28^{\circ} 47' 58.00200''$ N; $111^{\circ} 54' 55.54080''$ W) (Fig. 1). Cultivation of oysters followed the standard protocols (including maintenance and cleaning) used traditionally by oyster farmers in the region. Empty shells and moribund oysters were recovered monthly to estimate mortality. Samplings to determine the individual oyster growth were performed every 2 weeks, starting on May 9 and ending on December 10, 2014. Fifty oysters from each replicate of every lot were sampled, cleaned, and measured with an electronic caliper (shell length) in the laboratory.

Concomitantly, temperature, salinity, and dissolved oxygen were measured in the cultivation site with an YSI-85 multisensor probe during each sampling. Meanwhile, 1 L of seawater was sampled to estimate the chlorophyll *a* and seston concentrations. The chlorophyll *a* was determined by the methodology described by Parsons et al. (1984), while the seston was calculated following the procedures described in Strickland and Parsons (1972).

Growth model selection and parameter inference

Technically, only three different models were evaluated utilizing length-at-age data to determine the best-fitted model. Six equations were tested. The theory behind this statement is that the Schnute model has four solution cases, in spite of being a single model (Schnute 1981). The models described below were selected based on their prevalence in bivalve growth modeling studies (Schäffer and Zettler 2007; Nanbu et al. 2008; Chávez-Villalba and Aragón-Noriega 2015; Morales-Bojórquez et al. 2015).

The VBGM is given by:

$$L(t) = L_{\infty} \left(1 - e^{-k(t-t_0)} \right)$$

The logistic growth equation is given by:

$$L(t) = L_{\infty} \left(1 + e^{-k_2(t-t^*)} \right)^{-1}$$

The following parameters are used in these models:

- $L(t)$ Is the length at age t
- t Is the age in years
- L_{∞} Is the mean length of very old organisms (asymptotic length parameter)
- k Determines how fast L_{∞} is reached (curvature parameter)
- t_0 Is the hypothetical age at which the organism has zero length (initial condition parameter)
- k_2 Is the relative growth rate parameter
- t^* Is the inflection point of the sigmoid curve

The Schnute growth model (Schnute 1981) is a general four-parameter growth model that takes four mathematical forms depending on the values of a and b in relation to 0. In this study, we will describe Schnute case 1 when $a \neq 0$, $b \neq 0$, as follows:

$$L_t = \left\{ Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \left[\frac{1 - e^{-a(t-\tau_1)}}{1 - e^{-a(\tau_2-\tau_1)}} \right] \right\}^{\frac{1}{b}}$$

Schnute case 2 when $a \neq 0$, $b = 0$, as follows:

$$L_t = Y_1 \exp \left[\ln \left(\frac{Y_2}{Y_1} \right) \frac{1 - e^{-a(t-\tau_1)}}{1 - e^{-a(\tau_2-\tau_1)}} \right]$$

Schnute case 3 when $a = 0$, $b \neq 0$, as follows:

$$L_t = \left\{ Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \left[\frac{t - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \right] \right\}^{\frac{1}{b}}$$

Schnute case 4 when $a = 0$, $b = 0$, as follows:

$$L_t = Y_1 \exp \left[\ln \left(\frac{Y_2}{Y_1} \right) \frac{t - \tau_1}{\tau_2 - \tau_1} \right]$$

The following parameters are used in these models:

- τ_1 Is the lowest age in the data set
- τ_2 Is the highest age in the data set
- a Is the relative growth rate parameter
- b Is the incremental relative growth rate (incremental time constant)
- Y_1 Is the size at age τ_1
- Y_2 Is the size at age τ_2

The models were fitted using maximum likelihood. A multiplicative error structure was considered. The maximum likelihood fitting algorithm was based on the equation:

$$LL(\Phi|\text{data}) = -\left(\frac{n}{2}\right)(\ln(2\pi) + 2*\ln(\sigma) + 1)$$

where Φ represents the model parameters and σ represents the standard deviations of the errors, which are calculated using the following equation:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\ln L_{\text{obs}} - \ln \hat{L})^2}{n}}$$

The multi-model approach was used to select the best candidate growth model (Katsanevakis 2006) based on the AIC, defined as $AIC = -2LL + 2\theta_i$ where LL is the maximum log-likelihood and θ_i is the number of parameters in each model tested. The differences in AIC ($\Delta_i = AIC_i - AIC_{\text{min}}$) values were estimated among all of the models used in this study. The model with the lowest AIC value was chosen as the best model. To statistically decide the model fitness of the data, a criterion proposed by Burnham and Anderson (2002) was evaluated, in which $\Delta_i < 2$ is evidence of substantial support, $4 < \Delta_i < 7$ has some support, and $\Delta_i > 10$ shows essentially no support from data.

The plausibility of each model was estimated using the following formula for the Akaike weight:

$$W_i = \frac{e(-0.5\Delta_i)}{\sum_{k=1}^4 e(-0.5\Delta_k)}$$

Results

Environmental variables

Seawater variables showed seasonal variation characteristics of subtropical coastal lagoons (Table 1). The average temperature was 28.4 ± 4.5 °C, with maximum values in August (33 °C) and minimum in December (19.1 °C). Average salinity was 37.7 ± 1.4 ranging from 35 to 40, and the average dissolved oxygen was 6.4 ± 0.8 mg/L. Chlorophyll *a* varied between 1.4 and 6.5 µg/L with an average of 3.0 ± 1.6 µg/L, and the seston fluctuated between 4.9 and 10.3 mg/L with a mean of 7.5 ± 1.6 mg/L.

Table 1 Values of environmental variables during cultivation of distinct *Crassostrea gigas* stocks

Variable	Maximum—month	Minimum, month	Mean \pm SD
Temperature (°C)	33.0—August	19.1—December	28.4 ± 4.5
Salinity	40—April and June	35.2—September	37.7 ± 1.4
Oxygen (mg/L)	8.6—December	5.6—August	6.5 ± 0.8
Chlorophyll <i>a</i> (µg/L)	6.5—July	1.4—May	3.0 ± 1.6
Seston (mg/L)	10.3—May	4.9—December	7.5 ± 1.6

Oyster growth

In relation to the size of spat at the beginning of the experiment, an ANOVA test showed significant differences ($p < 0.05$) among all the stocks with a higher length for B followed by D, A, and C in that order.

Overall, the growth curves generated by the observed data described similar trends for the oysters from the four hatcheries. In every case, oyster growth began with high rates during the first 2 months, but the rates diminished from the third to the fourth month of cultivation, to increase again until the end of the study period (Fig. 2). Mortality at the end of the experiment was 11%, 5%, 3%, and 4% for hatcheries A, B, C, and D, respectively.

Growth curves generated by the models were also similar. With the exception of Schnute model case 4, the curves' behavior from the models in relation to the observed growth indicates a suitable adjustment (Fig. 3). At first glance, it is difficult to determine which model best describes the spat growth of each hatchery. Nevertheless, the values of the estimated AIC for each model allowed to identify which model best described the growth for each hatchery (Table 2). In the case of oysters from hatchery A, the model best describing the growth was that of von Bertalanffy (VBGM) with an AIC of -15.27 , followed by Schnute model case 1 with an AIC of -13.24 . For hatchery B, it was Schnute model cases 3 and 1 with AIC values of -0.46 and 0.53 , respectively. In the case of hatchery C, the best model was Schnute case 1 (AIC = -233.4) and then the VBGM (AIC = -230.3). For these three hatcheries, Schnute case 1 describes a curve in the form of an inverted exponential (typical of VBGM). Finally, for hatchery D, it was Schnute case 1 with an AIC = -73.30 (but the shape of the curve described in this case was sigmoid) and followed by the logistic model (AIC = -72.96).

In general, the models selected as “best” for each one of the four hatcheries yielded divergent lengths for each data set or oyster stock. Figure 4 shows this finding more clearly, although the curves were extended to an age of 1 year to accentuate the differences among the curves. If the curves are limited to the actual data used, the differences between the growth curves are difficult to detect, at first glance, for hatcheries B and C, but all of the growth curve shapes are clearly distinguishable with this predictive curve.

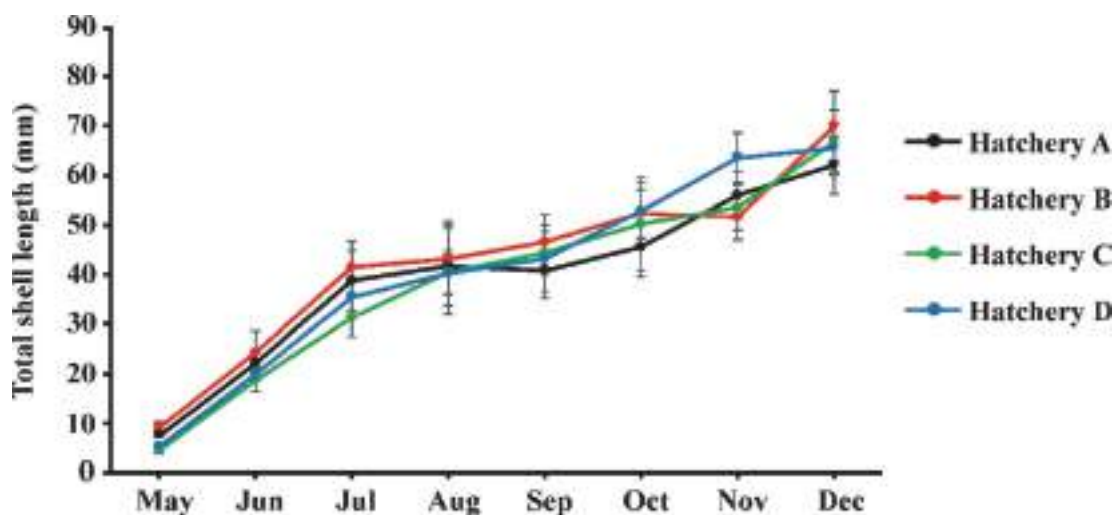


Fig. 2 Growth curves (mean shell length \pm SD) of four *Crassostrea gigas* stocks cultivated in La Cruz lagoon (Sonora, Mexico)

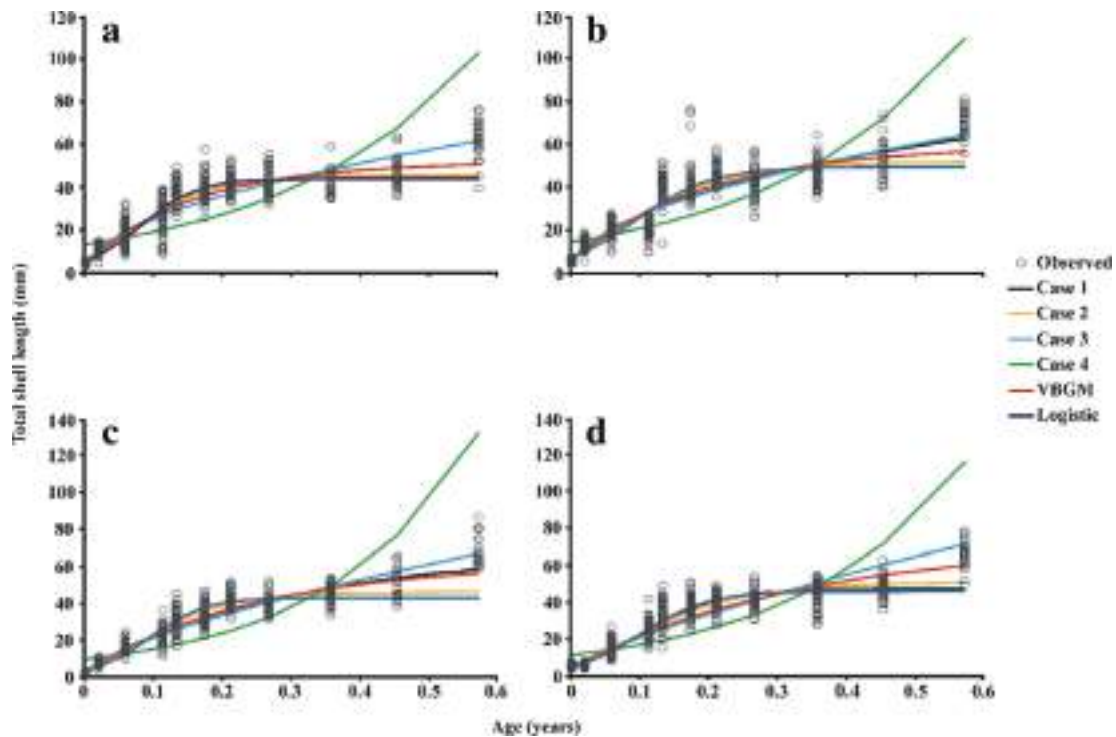


Fig. 3 a–d Growth curves generated by six models for each data set of Pacific oyster spat *Crassostrea gigas* produced in four different hatcheries (A, B, C, D). VBGM, von Bertalanffy growth model

Discussion

Initial size of the spat

In a previous study, we examined the problem of comparing the performance of various *C. gigas* oyster stocks considering that they presented differences in spat size at the beginning of the experiment (Reynaga-Franco et al. 2019). We found that a recurrent problem in all Mexican hatcheries is that they produce spat with heterogeneous size, and most of these operational difficulties are not reported in the scientific literature and they are resolved internally by each hatchery. Considering the experiment objectives, it was noted that each hatchery has its own production protocols and that it would be unlikely that these would be adjusted so that everyone would produce spat of similar size for the same date. We also discovered (Reynaga-Franco et al. 2019) that the effect of spat with different sizes could be relative on growth performance in this species, since the smallest spat at the beginning of the study showed the highest weight and the second best size by the end of the experiment. Therefore, there are other attributes, such as the genetic variability, epigenetics, the culture system, and density culture, which could have a greater influence on the biological performance of oyster (Dégremont et al. 2005; Chávez-Villalba 2014; Kong et al. 2015). The difficulty of homogenizing the initial spat size should be considered in future studies.

The effect of environmental variables and sexual maturity

The growth of *C. gigas* is influenced by the seasonality of environmental variables, mainly by food availability and temperature (Mondol et al. 2016; Haoui-Meslem et al. 2017;

Table 2 Values for the Akaike information criterion (AIC) obtained from the growth models adjusted to the average length—age data for four *Crassostrea gigas* stocks. The best model for each hatchery is in italics

Hatchery	Model	Φ	AIC	Δ_i	$W_i\%$	L_∞	$W_{i\infty}$
A	Schnute case 1	4	-13.24	2.03	26.62	50.54	13.45
	Schnute case 2	3	22.52	37.79	0.0	45.76	0.0
	Schnute case 3	3	41.36	56.54	0.0	61.70	0.0
	Schnute case 4	3	872.12	888.12	0.0	103.13	0.0
	<i>VBGM</i>	3	<i>-15.27</i>	<i>0.0</i>	<i>73.38</i>	<i>51.76</i>	<i>37.98</i>
	Logistic	3	72.07	87.34	0.0	43.98	0.0
B	Schnute case 1	4	0.53	0.99	37.87	62.74	23.76
	Schnute case 2	3	103.62	104.09	0.0	51.56	0.0
	<i>Schnute case 3</i>	3	<i>-0.46</i>	<i>0.0</i>	<i>62.13</i>	<i>64.46</i>	<i>45.05</i>
	Schnute case 4	3	717.37	717.38	0.0	109.45	0.0
	VBGM	3	28.93	23.39	0.0	59.40	0.0
	Logistic	3	156.48	156.94	0.0	49.39	0.0
C	<i>Schnute case 1</i>	4	<i>-233.36</i>	<i>0.0</i>	<i>82.27</i>	<i>58.16</i>	<i>47.85</i>
	Schnute case 2	3	-4.48	228.53	0.0	45.97	0.0
	Schnute case 3	3	-195.15	38.21	0.0	66.84	0.0
	Schnute case 4	3	1018.18	1251.55	0.0	132.48	0.0
	VBGM	3	-230.30	3.07	0.22	61.94	10.98
	Logistic	3	179.38	412.74	0.0	42.96	0.0
D	<i>Schnute case 1</i>	4	<i>-73.30</i>	<i>0.0</i>	<i>54.16</i>	<i>47.14</i>	<i>25.53</i>
	Schnute case 2	3	-59.79	13.51	0.06	50.50	0.03
	Schnute case 3	3	139.28	212.58	0.0	71.45	0.0
	Schnute case 4	3	833.16	906.46	0.0	116.33	0.0
	VBGM	3	59.43	132.74	0.0	71.88	0.0
	Logistic	3	-72.96	0.34	45.78	46.13	21.12

Roncarati et al. 2017; Lodeiros et al. 2018). For example, the concentrations of chlorophyll and seston indicated an abundance of food during the entire cultivation period. Temperature showed a marked seasonality with values exceeding 30–32 °C during summer confirming previous studies for this lagoon (Castro-Longoria and Grijalva-Chon 1991; Gárate-Lizárraga et al. 2013; Valenzuela-Castillo et al. 2015). The oysters of the four hatcheries followed a similar growth pattern over the experimental time. We observed that growth was rapid during the first 2 months of cultivation when the temperature was still increasing, but slower in the following 2 months when the temperature reached the

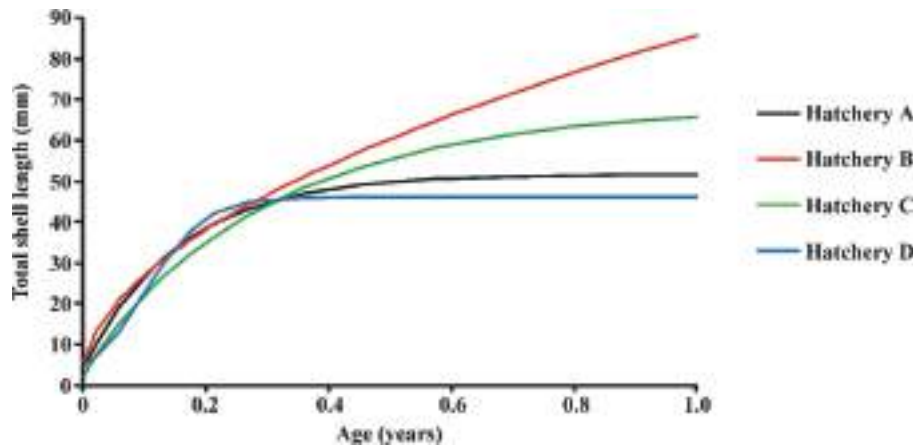


Fig. 4 Growth curves of Pacific oysters *Crassostrea gigas*, shaped by the model selected as best for each hatchery

highest values. Then, the growth became rapid again until the end of the cultivation period when the temperature started to decrease. Even with unlimited food supply from July to September, the effect of temperatures $>30\text{ }^{\circ}\text{C}$ drastically reduced the growth of the organisms during this period, considering that temperatures around $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ are optimal for the species (Samain et al. 2004; Sicard et al. 2006). Therefore, temperature patterns seemed to be the main factor influencing the growth of *C. gigas* in the present study. Nevertheless, in our previous study, we noticed that the effect of this variable seems stronger on shell growth than on weight growth, may be dissimilar on various oyster stocks, and depends on whether the temperature increases, stays high, or decreases (Reynaga-Franco et al. 2019).

Most mortalities were observed during the phase of high temperatures but values were low and similar for all the stocks. Even so, the greatest survival was observed in hatchery C, which the oysters are coming from a selective breeding program where survival rates are improving given that heritability in *C. gigas* is very high (Dégremont et al. 2007). Nevertheless, this fact seems to have had no significant effect on the overall mortality because, at the end, survival was very high indicating spat of good quality coming from all the hatcheries.

Together with environmental variables, reproduction events may also affect growth in bivalves (Pouvreau et al. 2006). *C. gigas* reproduction in Mexico indicates two situations: oysters cultivated on the Pacific side of the Peninsula are exposed to colder waters with gametes growing and maturing during spring and spawning in summer (Cáceres-Martínez et al. 2004) and oyster cultivated within the Gulf of California are exposed to warmer waters with gametes growing and maturing in spring but without spawning (gametes are reabsorbed; Chávez-Villalba et al. 2007). Our oysters were young during spring, unlikely developing a functional gonad in summer. Moreover, part of summer and autumn corresponds to a resting phase with minimum reproductive activity. Those elements suggest that reproduction events in this study did not have a significant effect on growth patterns of the different oyster stocks.

The utility of multi-model inference approach

Hypothesizing the seasonal growth in *C. gigas*, Góngora-Gómez et al. (2017) described the growth patterns of this species testing the seasonal model of von Bertalanffy and the traditional von Bertalanffy. Their conclusion was that the exotic species *C. gigas* exhibits a seasonal growth pattern under the cultivation conditions in a subtropical lagoon of the Gulf of California. Nevertheless, the native species *C. corteziensis* cultivated under similar environmental conditions (particularly of temperature) as the Pacific oyster did not show a seasonal growth pattern (Chávez-Villalba and Aragón-Noriega 2015). This shows the difficulty of finding a single model that can describe all growth patterns for bivalves.

Chávez-Villalba and Aragón-Noriega (2015) proved six models and selected the best model through the multi-model inference approach (MMI). In the present study, the MMI was implemented to describe the growth patterns of oysters produced in four different hatcheries. *C. gigas* in Mexico has one of the fastest growth rates in the world and oysters may reach the commercial size (80-mm shell length and/or 60-g total weight) in 8–9 months of cultivation (Chávez-Villalba 2014). In this study, we considered growth during 7 months where the oysters reached the length sizes between 62 and 70 mm. Although field experiment would have been improved by keeping the organisms up to the commercial size, it was shortened due to technical issues. Other studies have implemented growth experiments (<6 months) to determine a dynamic energy budget model for the species (Pouvreau et al. 2006). We consider,

therefore, that our experimentation lasting time was sufficient to establish an appropriate growth model to achieve the objective of our experiment. Appropriateness of the growth model in an organism subject to aquaculture is limited for the period of cultivation but it is enough for a particular objective of aquaculture experiments.

The main objective was to probe if the spat origin of the Pacific oyster *C. gigas* has an effect on growth during cultivation conditions. The hypotheses proven, via the models, are the growth patterns. Although the growth patterns were similar among the various stocks, those patterns adjusted to different growth models. If the selected model describes an asymptotic curve, it means that the oysters under cultivation reached their maximum growth potential. On the other hand, if the selected model described an indeterminate growth curve, it means that, at harvest time, the oysters have the potential to keep growing. In the present study, hatchery B was represented for case 3 of the Schnute model that describes an indeterminate growth in its shape of the curve. Although considering the observed environmental conditions, this means that the oysters produced in hatchery B could continue growing. The fact that these oysters were larger at the beginning of the study could likely have some effect on their growth pattern, but this needs to be confirmed by further additional studies. On the other hand, oysters produced in hatcheries A, C, and D apparently reached their maximum growth potential under the same cultivation conditions. If the cultivation period is extended, no further growth would be expected. Although these oysters started the experiment with significant size differences, the models described similar trends.

Potential effect of spat origin and infrastructure

The effect of temperature was the same for the four oyster stocks; consequently, other sources of variation could not only be the spat size but also the origin since each stock was produced by a different hatchery. It has been reported that the spat origin—specifically parents' genetic characteristics—influences the rate of growth and survival of the species (Dégremont et al. 2010; Nel et al. 2014). However, it has not been tested methodically which factors within the origin might be those who had more influence in this variation. One factor could be the geographical location of each hatchery, which is related to environmental conditions where they are located and maintain broodstock (frequently in areas close to the hatcheries). Usually, spat attributes come from the broodstock; in this study, with the exception of hatchery C, the breeders of hatcheries A, B, and D are selected by their physical characteristics and not from genetic attributes. In that sense, every stock comes from the crosses of different parents showing specific characteristics and adapted to local environmental conditions. *C. gigas* is highly tolerable to environmental changes and exhibits good adaptability to different geographic regions (Miossec et al. 2009; Troost 2010). This could be verified in this study observing the growth patterns of the different stocks confirming the large phenotypic growth plasticity of the species. Nevertheless, it is relevant to perform studies to determine the genetic broodstock variability to improve the spat quality.

Another element may be the overall hatchery infrastructures, which vary greatly among the four hatcheries involved. For example, in hatchery C, the production cycle, the seawater exchanges, the feeding of organisms, and the seawater temperature are automated, while other hatcheries operate manually. The production cycle of hatchery C is totally closed, while in other hatcheries, it is semi-closed. Comparatively, the functionality of the facilities of hatchery C allows a greater efficiency in production, as well as greater controls within each stage. We must consider also the influence of the production protocol in each hatchery. Guidelines for

producing bivalve spat (Utting and Spencer 1991; Helm et al. 2004; Spencer 2008) are well suited, and some of the processes described in those guides are modified depending on the geographic region, infrastructure, and technical capacity of the hatcheries. This generates infinite modified protocols that can influence produced spat quality. By way of example, the broodstock of hatchery C comes from a selective breeding program, whereas the original broodstock of other hatcheries was imported from the USA, with new breeders collected at each production cycle from local farms that the hatchery usually provide with spat. If we consider that the broodstock contributes to the genetic spat variability, the fact that the hatcheries select them differently can generate variation in spat quality. In summary, the geographic location, laboratory infrastructure, and modified protocols may be the cause of the variation in the growth patterns of the oysters identified in this study.

It is likely that protocol variants, not only those of the studied hatcheries but also of any hatchery in the world, could have greater influence than other factors on the spat quality produced. Although this requires further studies, it is possible to consider that spat quality seems more associated with production protocols than other aspects, as was found in the present study via the study of the growth performance. Therefore, we recommend carrying out an in-depth study of production protocols to identify critical stages and their influence on the attributes of the spat.

Genetics and epigenetics

Undoubtedly, in *C. gigas* the genetic aspects are related to growth patterns and survival (Dégremont et al. 2007; Gomes et al. 2018; Li et al. 2018; Wang et al. 2018). Although reproduction in hatcheries represents a phenotypic improvement based on the genetic variability available (Jiang et al. 2013), it has been reported that these procedures reduce genetic variability, since usually a small number of breeders participate (Grijalva-Chon et al. 2013). Unfortunately, in the case of hatcheries participating in this study, the genetic variability is not monitored among other reasons for the costs that represent these analyses. In addition, growth variations may also be due to epigenetics, as it has been demonstrated that DNA methylation in *C. gigas* has regulatory functions in the early development and in genes associated with stress and environmental response (Gavery and Roberts 2010; Riviere et al. 2017; Rondon et al. 2017). The controlled conditions in a hatchery try to limit the physiological stress and favor the optimal development of the organisms (Helm et al. 2004). Thus, we must question whether the methylation process in the hatcheries is not biased due to controlled environmental conditions. This is a subject that requires further investigation.

It is evident that the participating hatcheries should have at least some knowledge of the level of genetic variability and inbreeding levels of their oyster lines in order to have a more robust explanation about the differences in growth dynamics. But as far as we know, this is not in the plans of any of the participating hatcheries.

Conclusion

The conclusion of the present study was the corroboration that the growth of *C. gigas* can be variable under the same cultivation conditions. Although there is the possibility of the effect of spat size, we consider that the main effect is resulting from the spat origin. It is highly likely that the growth pattern will be influenced by the production protocol and undoubtedly this will

have an effect on the spat growth over a full rearing cycle. Considering that hatcheries have differences in their infrastructure and production protocols (maturation processes), then it is possible to generate a great number of spat variants. It is clear that there are many factors affecting the growth of *C. gigas* spat; here, we present significant information about the effect of some of them but more studies are needed to confirm the present results. Thus, it is important to contemplate studying the relationship between oyster spat production systems and their biological performance on the field, so that this knowledge can contribute to understanding oyster development and aquaculture in general.

Regarding the application of growth models in this study, we evidenced the difficulty to detect differences in growth patterns and discriminate to find the best models to represent it. We demonstrated that a way to find such differences was via the multi-model inference (MMI) approach. Therefore, if the objective is to determine the growth pattern of any aquaculture resource, the MMI could be used.

Acknowledgments Thanks to Martín Acedo-Valdez (UNISON), Víctor Vera and Francisco Hoyos-Chairez (CREMES), Edgar Alcántara-Razo, and Andrés Hernández-Ibarra (CIBNOR), for their logistic support in the field.

Funding information This study was funded by the Fundación Produce Sonora (project 898-1) with additional support from CIBNOR (project 900-721). Reynaga-Franco, F., was a recipient of a fellowship from CONACYT Mexico.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed by the authors.

References

- Aragón-Noriega EA (2013) Modelación del crecimiento individual del callo de hacha *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) a partir de la inferencia multi modelo. *Rev Biol Trop* 61:1167–1174
- Barraza-Guardado RH, Chávez-Villalba J, Atilano-Silva H, Hoyos-Chairez F (2009) Seasonal variation in the condition index of Pacific oyster postlarvae (*Crassostrea gigas*) in a land-based nursery in Sonora, Mexico. *Aquac Res* 40:118–128
- Barton A, Waldbusser GG, Feely RA, Weisberg SB, Newton JA, Hales B, Cudd S, Eudeline B, Langdon CJ, Jeffers I, King T, Suhrbier A, McLaughlin K (2015) Impacts of coastal acidification on the Pacific northwest shellfish industry and adaptation strategies implemented in response. *Oceanography* 28(2):146–159
- Buestel D, Ropert M, Prou J, Gouletquer P (2009) History, status, and future of oyster culture in France. *J Shellfish Res* 28:813–820
- Burge CA, Judah LR, Conquest LL, Griffin FJ, Cheney DP, Suhrbier A, Vadopalas B, Olin PG, Renault T, Friedman CS (2007) Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: the influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J Shellfish Res* 26:163–172
- Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. Springer-Verlag, New York
- Cáceres-Martínez J, Ramírez-Gutiérrez S, Vásquez-Yeomans R, Macías-Montes de Oca P (2004) Reproductive cycle and mortality of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California, Mexico. *J Shellfish Res* 3:795–801

- Castro-Longoria R, Grijalva-Chon J (1991) Variabilidad espacio-temporal de nutrientes y seston en la laguna costera La Cruz, Sonora. *Cienc Mar* 17:83–97
- Chávez-Villalba J (2014) Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica* 24:175–190
- Chávez-Villalba J, Aragón-Noriega E (2015) Modeling the individual growth of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae) from central Gulf of California. *Cah Biol Mar* 56:231–236
- Chávez-Villalba J, Villelas-Ávila F, Cáceres-Martínez C (2007) Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, Mexico. *Aquac Res* 38:268–278
- Corporeau C, Vanderplanke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, Huvet A, Madec S (2012) Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteome* 75:5554–5563
- Cruz-Vásquez R, Rodríguez-Domínguez G, Alcántara-Razo E, Aragón-Noriega EA (2012) Estimation of individual growth parameters of the Cortez geoduck *Panopea globosa* from the central Gulf of California using a multimodel approach. *J Shellfish Res* 31:725–732
- Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P (2005) Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249:213–229
- Dégremont L, Ernande B, Bédier E, Boudry P (2007) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262:41–53
- Dégremont L, Bédier E, Boudry P (2010) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299:21–29
- Dégremont L, Lamy JB, Pépin JF, Travers MA, Renault T (2015) New insight for the genetic evaluation of resistance to ostreid herpesvirus infection, a worldwide disease, in *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 10(6): e0127917
- Diederich S, Nehls G, Beusekom JV, Reise K (2005) Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? *Helgol Mar Res* 59:97–106
- Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi MH (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263:238–248
- FAO (2005–2018) In: Texto de Helm MM (ed) Cultured aquatic species information programme *Crassostrea gigas*. Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma (13 April 2005). http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es. Cited 17 January 2018
- Frias R, Segovia M (2010) Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: first step toward the development of conditioning and maturation protocols. *J Shellfish Res* 29:303–308
- Friedman CS, Estes RM, Stokes NA, Burge CA, Hargove JS, Barber BJ, Elston RA, Burreson EM, Reece KS (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis Aquat Org* 63:33–41
- Gárate-Lizárraga I, Poot-Delgado CA, Ramírez-Castillo ER, Páez-Hernández MH (2013) Proliferación de *Pseudo-nitzschia brasiliensis* y *P. cf. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) en el Estero Santa Cruz, norte del Golfo de California, México. *Rev Biol Mar Oceanogr* 48:393–399
- Gasmi S, Bernard I, Pouvreau S, Maurer D, Schaal G, Ganthy F, Cominassi L, Allain G, Sautour B, David V (2017) Spatial patterns in the condition index of the wild Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a macrotidal coastal ecosystem: influence of tidal processes and beyond. *J Sea Res* 119:28–36
- Gavery MR, Roberts SB (2010) DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics* 11:483
- Gomes RB, Dybas PR, Silva FC, Sühnel S, Albuquerque MCP, Melo CMR (2018) Estimates of genetic parameters for growth and survival in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Bol Inst Pesca* 44(2):e337
- Gompertz B (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new model of determining the value of life contingencies. *Philos Trans R Soc Lond* 115:513–583
- Góngora-Gómez AM, Aragón-Noriega EA, Domínguez-Orozco AL, Villanueva-Fonseca BP (2017) Modeling the individual growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated in the Gulf of California using the von Bertalanffy model. *Rev Biol Mar Oceanogr* 52:181–185
- Grijalva-Chon JM, Izaguirre-Castro O, Castro-Longoria R, López-Torres MA, Hoyos-Chaires F (2013) Variabilidad genética en ADN microsatélite de un nuevo linaje de ostión (*Crassostrea gigas*) en Sonora. *Biotechnia* 15(1):12–18
- Guo X, Ford SE, Zhang F (1999) Molluscan aquaculture in China. *J Shellfish Res* 18:19–31

- Haoui-Meslem N, Chávez-Villalba J, Alcántara-Razo E, Rezbani-Zahaf C (2017) Growth, condition and gametogenic activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Algeria. *Cah Biol Mar* 58:153–161
- Helm MM, Bourne N, Lovatelli A (2004) Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper No. 471. FAO, Rome
- Jiang Q, Li Q, Yu H, Kong LF (2013) Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes Genom* 35:641–647
- Katsanevakis S (2006) Modelling fish growth: model selection, multi-model inference and model selection uncertainty. *Fish Res* 81:229–235
- Kong N, Li Q, Yu H, Kong LF (2015) Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree. *Aquac Res* 46:499–508
- Li C, Wang J, Song K, Meng J, Xu F, Li L, Zhang G (2018) Construction of a high-density genetic map and fine QTL mapping for growth and nutritional traits of *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics* 19:626
- Lodeiros C, Rodríguez-Pesantes D, Márquez A, Revilla J, Chávez-Villalba J, Sonnenholzner S (2018) Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the eastern tropical Pacific. *Aquac Int* 26:337–347
- Miossec L, Le Deuff RM, Goulletquer P (2009) Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Coop Res Rep* 299:42
- Mondol MR, Kim CW, Kang CK, Park SR, Noseworthy RG, Choi KS (2016) Growth and reproduction of early grow-out hardened juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay, off the south coast of Korea. *Aquaculture* 463:224–233
- Morales-Bojórquez E, Aragón-Noriega EA, Aguirre-Villaseñor H, Calderon-Aguilera LE, Zepeda-Benitez VY (2015) Selection of models to predict *Panopea globosa* growth: application of a mixture probability distribution function. *J Shellfish Res* 34:129–136
- Nanbu R, Mizuno T, Sekiguchi H (2008) Post-settlement growth and mortality of brackishwater clam *Corbicula japonica* in the Kiso estuaries, central Japan. *Fish Sci* 74:1254–1268
- Nel A, Pitcher G, Richoux N, Jackson S (2014) Culture environment and hatchery of origin influence growth, condition and feeding organ morphology in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in South Africa. *Afr J Mar Sci* 36:481–491
- Neto RM, Zeni TO, Ludwig S, Horodesky A, Giroto MV, Castilho-Westphal GG, Ostrensky A (2013) Influence of environmental variables on the growth and reproductive cycle of *Crassostrea* (Mollusca, Bivalvia) in Guaratuba Bay, Brazil. *Invertebr Reprod Dev* 57:208–218
- Parsons TR, Maitia Y, Lalli CM (1984) A manual of chemical and biological methods for sea water analysis. Pergamon Press, Oxford, UK
- Pouvreau S, Bourles Y, Lefebvre S, Gangnery A, Alunno-Bruscia M (2006) Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *J Sea Res* 56:156–167
- Reynaga-Franco FJ, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Barraza-Guardado RH, Arreola-Lizárraga JA, Chávez-Villalba J (2019) Biological performance of *Crassostrea gigas* stocks produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions. *Aquac Res* 50:621–633
- Ricker WE (1975) Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bull Fish Res Board Can* 191:1–382
- Riviere G, He Y, Tecchio S, Crowell E, Gras M, Sourdain P, Guo X, Favrel P (2017) Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genet* 13(6):e1006807
- Robert R, Gérard A (1999) Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat Living Resour* 12:121–130
- Roncarati A, Felici A, Magi GE, Bilandžić N, Melotti P (2017) Growth and survival of cupped oysters (*Crassostrea gigas*) during nursery and pregrowing stages in open sea facilities using different stocking densities. *Aquac Int* 25:1777–1785
- Rondon R, Grunau C, Fallet M, Charlemagne N, Sussarellu R, Chaparro C, Montagnani C, Mitta G, Bachère AF, Cosseau C (2017) Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environ Epigenetics* 3(1):1–13
- Samain JF, Boudry P, Dégremont L, Soletchnik P, Ropert M, Bédier E, Martin JL, Moal J, Mathieu M, Pouvreau S, Lambert C, Escoubas JM, Nicolas JL, Le Roux F (2004) Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, overview of 3-year results of the cooperative “MOREST” Project. *J Shellfish Res* 23:309–310
- Schäffer F, Zettler ML (2007) The clam siphon as indicator for growth indices in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Helgol Mar Res* 61:9–16
- Schnute J (1981) A versatile growth model with statistically stable parameters. *Can J Fish Aquat Sci* 38:1128–1140

- Sicard MT, Maeda-Martínez AN, Lluch-Cota SE, Lodeiros C, Roldán-Carrillo LM, Mendoza-Alfaro R (2006) Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical–temperate transition zones. *Aquac Res* 37:1040–1049
- Spencer B (2008) Molluscan shellfish farming. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin no. 67, Ottawa
- Troost K (2010) Causes and effects of a highly successful marine invasion: case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *J Sea Res* 64:145–165
- Utting S, Spencer B (1991) The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research, Lab Leaflet 68, Lowestoft
- Valenzuela-Castillo A, Sánchez-Paz A, Castro-Longoria R, López-Torres MA, Grijalva-Chon JM (2015) Seasonal changes in gene expression and polymorphism in *hsp70* in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. *Mar Environ Res* 110:25–32
- Wang J, Li Q, Zhong X, Song J, Kong L, Yu H (2018) An integrated genetic map based of EST-SNPs and QTL analysis of shell color traits in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 492:226–236
- Zhu L, Li L, Liang Z (2009) Comparison of six statistical approaches in the selection of appropriate fish growth models. *Chin J Oceanol Limnol* 27:457–467

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

IV. DISCUSIÓN

El cultivo del ostión japonés es una de las actividades acuícolas más importantes a nivel mundial, y detrás de su tecnificación existen innumerables esfuerzos científicos y tecnológicos. Actualmente esta actividad enfrenta el reto de convertirse en una práctica sostenible, en este sentido los criaderos o laboratorios productores de semillas juegan un papel crucial. Las semillas son el principal insumo para desarrollar el cultivo de la especie comercialmente, pero a pesar de su relevancia, muchos aspectos de la producción en laboratorio no han sido estudiados. Además, recientemente se han reportado problemáticas asociadas al desempeño de las semillas en los cultivos, principalmente altas mortalidades y deficiencias en su crecimiento (Uriarte *et al.*, 2008).

El caso de los laboratorios mexicanos es un caso de estudio complejo y de gran interés. A pesar de contar con una tradición ostrícola de más de 40 años, la transferencia de tecnología a estos sistemas en general es limitada o prácticamente nula, considerando que los cultivos de ostión japonés en el país dependen totalmente de la producción de semillas en criaderos (Chávez-Villalba, 2014). Por lo tanto, se puede considerar que la producción nacional depende en gran medida de la eficiencia de estos sistemas.

V.1. Producción de semilla en laboratorio

Para evaluar la eficiencia de los laboratorios y la calidad de la semilla que producen, es necesario desarrollar protocolos que permitan garantizar la más alta calidad en las semillas. Lo anterior a través de detectar puntos críticos en los procesos y mejorar los protocolos de producción. En este trabajo se diseñó un protocolo con base en indicadores establecidos para la producción de semillas y su desempeño en los cultivos. El protocolo propuesto mostró sensibilidad al identificar diferencias entre los cuatro laboratorios analizados, la evaluación identificó debilidades y seis puntos críticos claves para la producción, evidenciando deficiencias en los controles u omisión de los mismos.

Tres de los seis puntos críticos se detectaron en la etapa de producción de gametos, éstos fueron; el bajo número de reproductores utilizados por cada desove, las cruzas sin control estricto entre diferentes líneas de ostiones, y no llevar a cabo estimaciones de las tasas de fertilización y eclosión. Determinar el número ideal de reproductores por desove ha

representado un reto desde que existe la actividad hasta la actualidad (Hedgecock y Sly, 1990). Además, se sabe que la pérdida de variabilidad genética es un problema común en los laboratorios de producción de semillas, no solo en el ostión japonés, y esto está asociado principalmente al bajo número de reproductores que participan en los eventos reproductivos (Smith y Conroy, 1992; Debnath *et al.*, 2016). Aunque la solución más obvia pareciera ser aumentar el número de reproductores, se debe considerar el aumento en los costos de operación para los laboratorios, por lo que los programas de mejoramiento genético pueden ser una alternativa a este problema (Li *et al.*, 2006).

Otro elemento a considerar es el número efectivo de reproductores, es decir, el número de progenitores que logran pasar su información genética a la siguiente generación. Se ha demostrado que las cualidades reproductivas varían individualmente, lo cual propicia que un reproductor tenga mayor éxito reproductivo que otro, por lo que un mayor número de reproductores no asegura del todo una mayor variabilidad genética (Boudry *et al.*, 2002; Appleyard y Ward, 2006). También debe considerarse que algunos laboratorios no sacrifican sus reproductores, esto significa que un progenitor puede aportar la mayoría de los rasgos genéticos a varias progenies. Esto aumenta los riesgos de endogamia en laboratorios que obtienen sus reproductores de granjas locales que compran sus semillas (Bierne *et al.*, 1998). Establecer el número efectivo de reproductores debe ser el criterio para determinar el número de reproductores utilizados por desove. Por otra parte, desconocer el número adecuado de reproductores por ciclo de producción representa una deficiencia técnica en la producción de semilla, que puede repercutir directamente en su desempeño comercial.

El segundo punto crítico identificado en esta área de producción, es no establecer líneas de reproducción entre el stock disponible, lo que dificulta llevar un control sobre los progenitores que pasan sus atributos genéticos a las semillas (Boudry *et al.*, 2002). Se ha reportado que la especie presenta alta variabilidad genética en poblaciones silvestres, debido a que participan grandes cantidades de individuos (Yu y Chu, 2007; Yu y Li, 2007).

Establecer diferentes líneas de reproducción representa un gran reto para los laboratorios comerciales, pero representaría establecer parámetros de calidad de primer nivel en las semillas que producen. Por otro lado, los programas de mejoramiento genético deben ser acompañados por protocolos de cruces entre diferentes líneas, para optimizar los recursos genéticos con los

que cuenta cada criadero. Una alternativa actual es la importación de gametos (Adams *et al.*, 2004), esto introduce nuevos genotipos enriqueciendo la variabilidad genética de sus semillas. Aunque ya se han propuesto guías para utilizar esta técnica, no es una práctica común entre los laboratorios (Tervit *et al.*, 2005).

En relación a la estimación de las tasas de crecimiento y eclosión, este parámetro es crucial para determinar la eficiencia del proceso de producción en los criaderos, sin embargo, los laboratorios evaluados no tienen rutinas para estimar estas tasas y el éxito de su proceso se basa en producir semillas “suficientes” para cumplir con la demanda comercial. Sumado a esto, en la fertilización y asentamiento la calidad del agua es determinante para el éxito o fracaso de este proceso (Barros *et al.*, 2013). Sin embargo, al no estimar estas tasas, no es posible determinar la eficiencia del sistema de producción.

De la misma manera, hay dos puntos críticos de la etapa del cultivo larvario: la estimación de la sobrevivencia y el asentamiento y metamorfosis, ya que históricamente en esta etapa del proceso de producción es donde se presentan las mayores mortalidades. Los laboratorios evaluados no estiman estos parámetros, por lo que no tienen elementos para diagnosticar mortalidades masivas o si estas están dentro de los estándares, por lo que en base a este desconocimiento es difícil aplicar mejoras en esta etapa del proceso.

V.2. Variabilidad genética

El último de los puntos críticos detectado por el protocolo corresponde a la determinación de la variabilidad genética, este parámetro es de vital importancia para las semillas ya que de esto depende la sobrevivencia, la tasa de crecimiento y la resistencia a patógenos (Pace *et al.*, 2006; Dégremont *et al.*, 2007). Sin embargo, los laboratorios analizados no lo evalúan, esto puede ser entendible si consideramos los costos de analizar cada lote que se comercializa.

Determinar la variabilidad genética de las semillas, representa ofrecer un producto de alto valor comercial, ya que una buena variabilidad determina un buen desempeño biológico (Xu *et al.*, 2017) y reduce los riesgos de endogamia a causa del reducido número de reproductores usados por desove (Grijalva-Chon *et al.*, 2013). La variabilidad genética juega un papel tan importante en el éxito de los cultivos que se ha descrito como la mejor alternativa contra el herpesvirus de los ostreidos. Existe evidencia de que organismos con amplia

variabilidad presentan mayor sobrevivencia a este patógeno (Dégremont *et al.*, 2011; Rodgers *et al.*, 2018). Es por ello que muchos ostricultores han optado por cultivar organismos triploides, ya que presentan una mayor tasa de crecimiento y mayor resistencia a patógenos que los organismos diploides (Duchemin *et al.*, 2007; Azéma *et al.*, 2016).

El rubro de la variabilidad genética es quizás el más complicado de controlar para los laboratorios ya que se debe considerar el papel de la selección de los reproductores que conforman el stock de cada criadero, el número de organismos que intervienen en cada desove, incluso el número efectivo de reproductores. La problemática estriba principalmente en el incremento de los costos que representa establecer estos controles, para garantizar una buena variabilidad en las semillas comercializadas.

En este trabajo los marcadores moleculares mitocondriales reportados en la literatura (Arinishi y Okimoto, 2005; Kawamura *et al.*, 2017) no fueron eficientes, estos oligos fueron diseñados en base a poblaciones silvestres de Japón y la República de Corea, por lo que es probable que a más de 40 años de introducción de la especie a nuestro país exista un proceso de diferenciación genética que propició no obtener amplificaciones de la región mitocondrial.

V.3. Patógenos

Los patógenos presentan una amenaza para los cultivos comerciales del ostión japonés en México, ya que en el Golfo de California se ha registrado la presencia de OsHV-1, incluso con variantes nativas (Grijalva-Chon *et al.*, 2013; de La Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2017). Otras amenazas son *Perkinsus marinus* (Cacerés-Martínez *et al.*, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Martínez-García *et al.*, 2017; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015) y *Marteilia refringens* (Grijalva-Chon *et al.*, 2015; Martínez-García *et al.*, 2017), considerados los principales patógenos para la especie. En este trabajo no se encontraron patógenos en ninguna etapa del cultivo experimental, a pesar de los ya mencionados reportes de mortalidades en la zona del cultivo, lo cual indica que las semillas cuentan con buena resistencia y que los protocolos seguidos en los laboratorios son adecuados.

V.4. Variabilidad ambiental y desempeño biológico

El crecimiento se considera el principal indicador de éxito en los cultivos comerciales, los cuatro lotes cultivados presentaron tasas de crecimiento similares, además el crecimiento para los cuatro lotes son los más rápidos reportados para la especie en México (Castillo-Durán *et al.*, 2010; Chávez-Villalba, 2014), así como de las más rápidos en el mundo (Baghurts y Michell, 2002; Handley 2002; Gangnery *et al.*, 2003).

El crecimiento de la concha para los cuatro lotes no presentó anomalías y presentó las características reportadas para la especie, un crecimiento mayor en temperaturas frías y uno menor en condiciones cálidas (Haoui-Meslem *et al.*, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2018; Lodeiros *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

A pesar de la evidente influencia de la temperatura en el crecimiento de la concha, el crecimiento en peso se mantuvo constante, es decir que, aunque la concha detuvo su crecimiento, la producción de carne se mantuvo. Este mecanismo no ha sido reportado en otros cultivos, y puede estar asociado a los altos valores de fitoplancton y seston encontrados en la laguna, de igual manera puede tratarse de un mecanismo adaptativo de la especie.

El índice de condición en general se mantuvo por arriba de 50, lo cual indicó una buena condición durante el cultivo. Este se vio influenciado por la temperatura, lo cual se ha descrito ampliamente su efecto en la especie (Barraza-Guardado *et al.*, 2009; Castillo-Durán *et al.*, 2010; Fuhrmann *et al.*, 2018). Los valores constantes del índice de condición pueden explicarse con la abundancia de alimento durante todo el ciclo de cultivo, ya que la disponibilidad de alimento está relacionada con la condición fisiológica de la especie (Cilenti *et al.*, 2018).

La importancia de los parámetros del agua va más allá de la regulación del desempeño biológico de la especie. Las variaciones ambientales están asociadas a la proliferación de enfermedades y a la calidad nutricional de la especie y sus valores comerciales (Pereira *et al.*, 2006; Dégremon *et al.*, 2011). En este estudio las variables ambientales mostraron variaciones estacionales habituales en el Golfo de California (Padilla-Serrato *et al.*, 2017; Chávez-Sánchez *et al.*, 2018), la temperatura de la laguna La Cruz, se mantuvo en los rangos reportados para la región, con los valores mayores en el periodo de primavera y verano en relación al invierno (Castro-Longoria y Grijalva-Chon, 1991; Valdez-Holguín, 1994). Esto se atribuye a la temperatura atmosférica y la escasa precipitación en la región (Obeso-Nieblas *et al.*, 2008),

además predominaron las condiciones de alta salinidad reportadas anteriormente por Valdez-Holguín (1994) y Garate-Lizárraga *et al.* (2013).

Los valores de clorofila *a* y seston presentes durante el cultivo experimental son de los más altos en el Golfo de California (Chávez-Villalba *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2015; Rodríguez-Quiroz *et al.*, 2016), estas concentraciones están relacionadas principalmente a los efluentes de granjas camaronícolas asentadas en los márgenes de la laguna (Barraza-Guardado *et al.*, 2013; López-Torres *et al.*, 2013), en otros cuerpos de agua del Golfo de California, también se ha reportado que las actividades antropogénicas son las principales fuentes de estos elementos en las lagunas de la región (Newell *et al.*, 2004; Soto-Jiménez *et al.*, 2008; Jara-Marini *et al.*, 2014).

V.5. Modelaje por la Inferencia Multi Modelo

El análisis del crecimiento, en los cultivos de moluscos se da en base a la observación directa de valores puntuales, en ocasiones esta puede ser subjetiva e imprecisa, dependiendo de la dispersión de los datos analizados, las herramientas y técnicas de medición, por lo que la implementación de la inferencia multimodelo aporta mayor precisión en el análisis de los patrones de crecimiento. En este trabajo el ajuste de los modelos a los sets de datos, fue sensible a los efectos de la temperatura en el crecimiento de la concha, el ajuste de los datos fue tan preciso, que evidenció que a pesar de tratarse de la misma especie y estar cultivada bajo las mismas condiciones ambientales y de cultivo, el crecimiento no fue idéntico, lo que propició un ajuste a modelos de crecimiento diferentes.

Se debe considerar que, al cultivar los cuatro lotes en condiciones idénticas, cualquier diferencia en los patrones de crecimiento debe estar ligado a alguna variable externa al cultivo, en este caso al proceso de producción de semilla, que es la única fuente de variación en el experimento. Como se describe antes analizar las posibles fuentes de variación dentro de los cuatro laboratorios es complejo, la principal fuente de variación en ellos son sus reproductores, ya que ellos aportan las condiciones genéticas que determinan los patrones de crecimiento individual, (Dégremont *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2018).

Otro elemento derivado del aporte genético de los reproductores es la epigenética, es decir las variaciones genómicas que se expresan ante estímulos ambientales, analizar este parámetro podría explicar cómo las variables ambientales influyeron, para que cada lote ajustara

a un modelo en particular (Jiang *et al.*, 2013; Riviere *et al.*, 2013) para asociar este resultado a este parámetro es necesario realizar estudios altamente especializados.

A pesar del éxito de la inferencia multimodelo en este trabajo, existe un debate científico acerca de la pertinencia de esta herramienta en la acuicultura, además a partir del uso de la IMM, se ha discutido la “universalidad” del modelo de von Bertalanffy para modelar el crecimiento de la mayoría de especies de interés acuícola y pesquero (Burham y Anderson, 2002). Nuestros resultados avalan lo descrito por Aragón Noriega *et al.* 2013, quienes han señalado que no es el mejor modelo para describir el crecimiento de los bivalvos. Más allá de intentar justificar a un modelo u otro, la discusión debiera encaminarse a definir si existe realmente un modelo universal para describir el crecimiento de los bivalvos o siempre se requerirá buscar el modelo que mejor se ajuste a los datos. Para esta finalidad se requiere mayores esfuerzos en la investigación de esta disciplina.

V.6. Protocolo para evaluar la calidad de la semilla producida en laboratorio

En base al protocolo integral propuesto en este trabajo, la calidad de la semilla se considera regular. Esto fue validado con un buen desempeño de las semillas en campo, por lo tanto, se puede considerar que, si los laboratorios aplicarán las medidas correctivas propicias en los puntos críticos de su producción, las semillas mejorarían su desempeño biológico y por ende la actividad ostrícola en general. Tanto el diseño, como la aplicación y la estructura del protocolo presentado en este trabajo, están sujetos a mejoras y futuras validaciones. Este primer acercamiento a una evaluación demostró pertinencia, practicidad y sensibilidad en los laboratorios analizados, por lo que se recomienda su aplicación futura.

V. CONCLUSIONES

- Los laboratorios productores de semilla de ostión *Crassostrea gigas*, están tecnificados adecuadamente para satisfacer la demanda comercial de este insumo.
- Los protocolos profilácticos en los laboratorios son adecuados, además las semillas presentan buena resistencia a los principales patógenos de la especie con antecedentes en la zona del cultivo experimental.
- Las semillas cultivadas en este trabajo presentaron tasas de crecimiento, consideradas dentro de las más rápidas a nivel mundial.
- Las condiciones sanitarias y ambientales de la laguna La Cruz, son propicias para el desarrollo del cultivo del ostión japonés, ya que favorece a un rápido crecimiento y a una buena condición fisiológica de los organismos.
- La variabilidad ambiental en la laguna La Cruz, presenta marcadas variaciones estacionales, además de una alta productividad y altas concentraciones de seston.
- La temperatura es el factor ambiental que representa mayor influencia, en los cultivos comerciales de la especie.
- La inferencia multimodelo permitió establecer una comparación profunda en los patrones de crecimiento de los lotes cultivados y analizados en este trabajo. Los cuatro sets de datos presentaron un buen ajuste a los modelos en general, a excepción del Schnute caso 2.
- Existe una diferenciación genética considerable que debe de ser evaluada entre las poblaciones mexicanas y las poblaciones silvestres endémicas de Japón y la República de Corea.
- El protocolo integral propuesto en este trabajo, es el primer acercamiento a una evaluación que puede ser aplicada a cualquier criadero o laboratorio de producción de semilla de ostión japonés en el mundo.
- El protocolo permite identificar todas las áreas de mejora dentro de un laboratorio productor de semilla, y al mismo tiempo se puede identificar las áreas de oportunidad de puntos específicos de producción, lo que coadyuva a la mejora continua.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros laboratorios de México con el protocolo diseñado en este trabajo y posteriormente en otros países.
- Solicitar retroalimentación por parte del personal de los laboratorios evaluados en este trabajo, para fortalecer la practicidad y pertinencia del protocolo.
- Analizar la variabilidad genética de las semillas producidas en los laboratorios del noroeste de México, utilizando microsatélites.
- Evaluar el estado trófico de la laguna La Cruz.
- Modelar el índice de condición en los cultivos comerciales de ostión japonés en el noroeste de México.

VII. LITERATURA CITADA

- Adams, S.L., J.F. Smith, R.D. Roberts, A.R. Janke, H.F. Kaspar, H.R. Tervit, P.A. Pugh, S.C. Webb y N.G. King. 2004. Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production. *Aquaculture*, 242: 271-282.
- Allendorf, F.W. y G. Luikart. Conservation and the Genetics of Populations. John Wiley and Sons. Blackwell, Oxford.
- Akashige, S. y Y. Kusuki. 1996. Artificial induction and larval survival of triploids in the oyster *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the Hiroshima Fisheries Experimental Station*, 19: 1-20.
- Alderman, D.J. 1979. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fisheries Review*, 41: 67-69.
- Appleyard, S.A. y R.D. Ward. 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 254: 148-159.
- Aragón-Noriega, E.A., R. Cruz-Vázquez, G. Domínguez-Rodríguez, E. Alcantara-Razo, G. Lucero-Cortez y C.A. Rascón-León. 2014. Teoría de la información, inferencia de multimodelos y fuente de datos para modelar el crecimiento individual de almeja de sifón *Panopea globosa*. *Ciencia Pesquera*, 22: 19-28.
- Aragón-Noriega, E.A. 2013. Modelación del crecimiento individual del callo de hacha *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) a partir de la inferencia multi modelo. *Revista de Biología Tropical*. 61(3): 1167-1174.
- Arinichi, F. y T. Okimoto. 2005. Sequence polymorphism in a novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. *Journal of Applied Genetics*, 46: 201-206.
- Azéma, P., M.A. Travers, A. Benabdelmouna and L. Dégremont. 2016. Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *Journal of invertebrate pathology*, 139. 92-101.
- Azevedo, C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology*, 75: 627-635.
- Baghurst, B.C. y J.G. Mitchell. 2002. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *Aquaculture Research*, 33: 1253–1263.

- Banks, M.A., D.J. McGoldrick, W. Borgeson y D. Hedgecock. 1994. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Marine Biology*, 121: 127-135.
- Barillé, L., J. Prou, M. Héral y D. Razet. 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212: 149-172.
- Barg, U.C. 1994. Orientaciones para la promoción de la ordenación medioambiental del desarrollo de la acuicultura costera. FAO Documento Técnico de Pesca. 328. 138 p.
- Barraza-Guardado, R.H., J. Chávez-Villalba, H. Atilano-Silva y F. Hoyos-Chairez. 2009. Seasonal variation of the Condition Index of Pacific oyster postlarvae (*Crassostrea gigas*) in a land-based nursery in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 40: 118-128.
- Barraza-Guardado, R. H., J.A. Arreola-Lizárraga, M.A. López-Torres, R. Casillas-Hernández, A. Miranda-Baeza, F. Magallón-Barrajas y C. Ibarra-Gámez. 2013. Effluents of shrimp farms and its influence on the coastal ecosystems of Bahía de Kino, Mexico. *The Scientific World Journal*. Article ID 306370, 8 pages, 2013.
- Barros, P., P. Sobral, P. Range, L. Chicharo y D. Matias. 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 440: 200-206.
- Bierne, N., S. Launey, Y. Naciri-Graven y F. Bonhomme. 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 148: 1893-1906.
- Boom, J.D.G., E.G. Boulding y A.T. Beckenbach. 1994. Mitochondrial DNA variation in introduced populations of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 1608-1614.
- Boscolo R., M. Cornello y O. Giovanardi. 2003. Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) farming systems. *Aquaculture International*, 11: 243–254.
- Boudry, P., S. Heurtebise, B. Collet, F. Cornette y A. Gerard. 1998 Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) populations and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 226: 279-291.

- Boudry, P., B. Collet, F. Cornette, V. Hervouet y F. Bonhomme. 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 204: 283-296.
- Brown, J.R. 1988. Multivariate analyses of the role of environmental factors in seasonal and site-related growth variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Ecology Progress Series*, 45: 225-236.
- Brown, J.R. y E.B. Hartwick. 1988. Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Condition index and survival. *Aquaculture*, 70: 253-267.
- Brown, M., y R. Robert. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207: 289-309.
- Burnham, K.P. y D.R. Anderson. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical informationtheoretic approach. Springer. New York. EUA.
- Buroker, N., W.K. Hershberg y K. Chew. 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32: 2471–2477.
- Buroker, N.E., W.K. Hershberger y K.K. Chew. 1979. Population genetics of the family Ostreidae, I: intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54: 157-169.
- Cáceres-Martínez, C., D. Ramírez-Filippini, J. Chávez-Villalba y O. Peñaloza-Ayala. 1988. Diseño y manejo de costales y estantes para el cultivo de moluscos (ostiones). *Acuavisión*, 3: 8-10.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. 327-337 p. En: Lovatelli, A. (Ed.), Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura 12.
- Cáceres-Martínez, J., M. García-Ortega, R. Vásquez-Yeomans, T.J. Pineda-García, N.A. Stokes y R.B. Carnegie 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster

- Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 321-325.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam y P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 294-307.
- Cahour, A. 1979. *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. *Marine Fisheries Review*, 41: 19-20.
- Calvo, G., M.W. Luckenbach, S.K. Allen y E.M. Bureson. 1999. Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research*, 18: 465–473.
- Castillo-Durán, A., J. Chávez-Villalba, A. Arreola-Lizárraga y R. Barraza- Guardado. 2010. Comparative growth, condition, and survival of juvenile oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* cultivated in summer and winter. *Ciencias Marinas*, 36: 29-39.
- Castro-Longoria, R. y J. M. Grijalva-Chon. 1991. Variabilidad espacio-temporal de nutrientes y seston en la Laguna Costera La Cruz, Sonora. *Ciencias Marinas*. 17: 83-97.
- Chávez-Villalba, J, M.R. López-Tapia, J. M. Mazón-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 36: 1337–1344.
- Chávez-Villalba, J., A. Arreola-Lizárraga, S. Burrola-Sánchez y F. Hoyos-Chairez. 2010. Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture*, 300: 128-136.
- Chávez-Villalba, J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24: 175-190.
- Chavez- Villalba J. y A. Aragón-Noriega. 2015. Modelling the individual growth of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis*, (Bivalvia: Ostreidae) from central Gulf of California. *Cahiers of Biologie Marine*, 56: 231-236.
- Chávez-Sánchez, T., A. Piñón-Gimate, E. Serviere-Zaragoza, J.M. López-Bautista y M. Casas-Valdez. 2018. Ulva blooms in the southwestern Gulf of California: Reproduction and biomass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 200: 202-211.
- Cilenti, L., T. Scirocco, A. Specchiulli, M.L. Vitelli, C. Manzo, A. Fabbrocini y R. D'adamo. 2018. Quality aspects of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) reared in the Varano

- Lagoon (southern Italy) in relation to marketability. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98: 71-79.
- CONAPESCA. 2012. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2012. México.
- Coon, S.L. y D.B. Bonar. 1986. Norepinephrine and dopamine content of larvae and spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *The Biological Bulletin*, 171: 632-639.
- Coss, C.A., J.A. Robledo y G.R. Vasta. 2001. Fine structure of clonally propagated in vitro life stages of a *Perkinsus* sp. isolated from the Baltic clam *Macoma balthica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 38-51.
- Crosby, M.P. y L.D. Gale. 1990. A review and evaluation on bivalve condition index methodologies with a suggested standard methods. *Journal of Shellfish Research*, 9: 233-237.
- De-la-Re-Vega, E., A. Sánchez-Paz, C. Gallardo-Ybarra, M.A. Lastra-Encinas, R. Castro-Longoria, J.M. Grijalva-Chon, M.A. López-Torres y A.D. Maldonado-Arce. 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish and Shellfish Immunology*, 71: 127-135.
- Debnath, P., S.H. Khan, M. Karim, B. Belton, C.V. Mohan y M. Phillips. 2016. Review of the history, status and prospects of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hatchery sector in Bangladesh. *Reviews in Aquaculture*, 8: 301-313.
- Dégremont, L., B. Ernande, E. Bédier, y P. Boudry. 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture*, 262: 41-53.
- Dégremont, L. 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*, 317: 94-98.
- Deslous-Paoli, J.M. y M. Heral. 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources*, 1: 239-249.
- Dridi, S., M.S., Romdhane y M.H. Elcafsi. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263: 238-248.

- Dos Santos A.E. y I.A. Nascimento. 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal development of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *Aquaculture*, 47: 335-352.
- Douillet, P.A., y C.J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 119: 25-40.
- Duarte, C. M., N. Marbá y M. Holmer. 2007 Rapid domestication of marine species. *Science*, 316: 382-383.
- Azmin, M.B., M. Fournier y M. Auffret. 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 264: 73-81.
- Enriquez-Espinoza, T.L. y J.M. Grijalva-Chon. 2010. Variabilidad genética de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis* de un laboratorio de producción del noroeste de México. *Ciencias Marinas*, 36: 333-344.
- Enríquez-Espinoza, T., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria y J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89: 269-273.
- Enríquez-Espinoza, T.L., R. Castro-Longoria, F. Mendoza-Cano y J.M. Grijalva-Chon. 2015. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, Mexico. *Biocencia*, 17: 10-13.
- Escobedo-Fregoso, C., I. Arzul, N. Carrasco, J.N. Gutiérrez-Rivera, R. Llera-Herrera y R. Vázquez-Juárez. 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62: 137-147.
- Evans, F., S. Matson, J. Brake, y C. Langdon. 2004. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 230: 89-98.
- FAO. 2005. Cultured Aquatic Species Information Program *Crassostrea gigas*. In: Helm MM, Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 3 April 2005. [Consultado 28 noviembre 2018]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es

- FAO. 2018. Species Fact Sheets, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973). In: Fisheries and Aquaculture Department [Consultado 18 May 2018] <http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>
- Fabioux, C., A. Huvet, P. Le Souchu, M. Pennec y S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250: 458-470.
- Farley, C.A., W.G. Banfield, G. Kasnic Jr. y W.S. Foster. 1972. Oyster herpes-tipe virus. *Science*, 178: 759-760.
- Ferreira, M.E. y D. Grattapaglia. 1996. Introducao ao uso de marcadores moleculares em análise genética, Ed.2 EMGRAPA-CENARGEN, Brasilia. Brasil.
- Ford, S.E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change. *Oceanographic Literature Review*, 12: 1265.
- Fuhrmann, M., L. Delisle, B. Petton, C. Corporeau y F. Pernet. 2018. Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biology Open*, 7: 2, bio028134.
- Gangnery, A., J.M. Chabirand, F. Lagarde, P. Le Gall, J. Oheix, C. Bacher y D. Buestel. 2003. Growth model of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, cultured in Thau Lagoon (Méditerranée, France). *Aquaculture*, 215: 267-290.
- Gárate-Lizárraga, I., C.A. Poot-Delgado, E.R. Ramírez-Castillo y M.H. Páez-Hernández. 2013. Proliferación de *Pseudo-nitzschia brasiliensis* y *P. cf. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) en el Estero Santa Cruz, norte del Golfo de California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48: 393-399.
- García-Gallo, M.D.C. 2001. Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Universidad y Ciencia*, 17: 83-91.
- Grijalva-Chon, J.M., R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes, T.L. Enríquez-Espinoza y F. Mendoza-Cano. 2013. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. *Journal of Fish Diseases*, 36: 965-968.
- Grijalva-Chon, J.M., R. Castro-Longoria, T.L. Enríquez-Espinoza, A.N. Maeda-Martínez y F. Mendoza-Cano. 2015. Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia*

- refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California. Latin American Journal of Aquatic Research, 43: 776-780.
- Grijalva-Chon, J.M., O. Izaguirre-Castro, R. Castro-Longoria, M.A., López-Torres y F. Hoyos-Chairez. 2013. Variabilidad genética en ADN microsatélite de un nuevo linaje de ostión (*Crassostrea gigas*) en sonora. Biotecnia, 15: 12-18.
- Gutierrez, A.P., O. Matika, T.P. Bean y R.D. Houston. 2018. Genomic selection for growth traits in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): potential of low-density marker panels for breeding value prediction. Frontiers in Genetics, 9: 391-401.
- Haoui-Meslem, N., J. Chavez-Villalba, E. Alcantara-Razo y C. Rebzani-Zahaf. 2017. Growth, condition and gametogenic activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Algeria. Cahiers de Biologie Marine, 58: 153-161.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. 1-9 p. En: Goldstein, D. B. y Schlötterer, C. (Eds), Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press.
- Handley, S.J. 2002. Optimizing intertidal Pacific oyster (Thunberg) culture, Houhora Harbour, northern New Zealand. Aquaculture Research, 33:1019-1030.
- Hedgecock, D. y F. Sly. 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 88: 21-38.
- Helm, M.M. N. Bourne y A. Lovatelli. (comp./ed.). 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 177p.
- Hidalgo-De La Toba, J.A., S.S. Gonzalez-Pelaez, E. Morales-Bojórquez, J.J. Bautista-Romero y D.B. Lluch-Cota. 2015. Geoduck *Panopea generosa* growth at its southern distribution limit in North America using a multimodel inference approach. Journal of Shellfish Research, 34: 91-99.
- Herrbach, B. 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne. Revue des Travaux de l'Institut des Meches Maritimes, 35: 79-87.
- His, E. y R. Robert. 1987. Impact des facteurs anthropiques sur le recrutement de l'huître: l'exemple du bassin d'Arcachon. Oceanis, 13: 317-335.
- Hoyos-Chairez, F.J. 2004. Ostricultura sonorensis; antecedente, presente y perspectiva de desarrollo sustentable. pp 2-11. En: Zárata-Valdez, J.L. (Ed.), Foro Intercambio de Experiencias en Agricultura y Desarrollo Rural Sustentables. Hermosillo, México.

- Huvet, A., C. Fabioux, H. McCombie, S. Lapegue y P. Boudry. 2004. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series*, 272: 141-152.
- Hwang, J.Y., J.J. Park, H.J. Yu, Y.B. Hur, I. Arzul, Y. Couraleau y M.A. Park. 2013. Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal of Fish Diseases*, 36: 969-972.
- Islas-Olivares, R. 1975. El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. *Ciencias Marinas*, 2: 58-59.
- Jara-Marini, M.E., F. Páez-Osuna y M.F. Soto-Jiménez. 2014. Trophic relationships within a subtropical estuarine food web from the southeast Gulf of California through Analysis of stable isotopes of Carbon and Nitrogen. 77-91 p. En: Amezcua, F. y Bellgraph, P. (Eds.) *Fisheries management of Mexican and Central American Estuaries*. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Jiang, Q., Q. Li, H. Yu y L.F. Kong. 2013. Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes and Genomics*, 35: 641-647.
- Kawamura, K., T. Miyake, M. Obata, H. Aoki y A. Komaru. 2017. Population demography and genetic characteristics of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70: 211-221.
- Kleeman, S.N., y R.D. Adlard. 2000. Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40: 137-146.
- Kobayashi, M., E. Hofmann, E.N. Powell, J.M. Klinck y K. Kusaka. 1997. A population dynamics model for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 149: 285-321.
- Koch, V., A. Rengstorf, M. Taylor, J.M. Mazón-Suástegui, F. Sinsel, y M. Wolff. 2015. Comparative growth and mortality of cultured Lion's Paw scallops (*Nodipecten subnodosus*) from Gulf of California and Pacific populations and their reciprocal transplants. *Aquaculture Research*, 46: 185-201.
- Lannan, J.E., A. Robinson y W.P. Breese. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, 21: 337-345.

- Langdon, C., F. Evans, D. Jacobson y M. Blouin. 2003. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture*, 220: 227-244.
- Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet y F. Berthe. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*, 15: 251-258.
- Lester, R. y J.G.H. Davis. 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37: 181-187.
- Li, Q., H. Yu y R. Yu. 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture*, 259: 95-102.
- Linehan, L.G., T.P. O'connor, y G. Burnell. 1999. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry*, 64: 211-214.
- Lodeiros, C., B. Marín y A. Prieto. 1999. Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela: Clase Bivalvia. Ediciones APUDONS. Caracas, Venezuela.
- Lodeiros, C., D. Rodríguez-Pesantes, A., Márquez, J. Revilla., J. Chávez-Villalba y S. Sonnenholzner. 2018. Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Eastern Tropical Pacific. *Aquaculture International*, 26: 337-347.
- Loosanoff, V.L. 1965. Gonad development and discharge of spawn in oysters of Long Island Sound. *Biological Bulletin*, 129: 546-561.
- López-Torres, M. A., B.E. Chomina-Huérigo, M. Á. Haros-Méndez, R.H. Barraza-Guardado, y E. Valdez-Holguín. 2013. Determinacion de la carga de bacterias en zona de efluente camaronícola. *Biotecnia*, 15:1, 33-38.
- Martínez-López, A., D. Escobedo-Urías, A. Reyes-Salinas y M.T. Hernández-Real. 2007. Phytoplankton response to nutrient runoff in a large lagoon system in the Gulf of California. *Hidrobiológica*, 17: 101:112.
- Martínez-García, M.F., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, J.E. Chávez-Villalba, T.L. Enríquez-Espinoza, A.N. Maeda-Martínez, E. Peña-Messina. 2017. OsHV-1 and notifiable protozoa in healthy *Crassostrea corteziensis* cultured in two distant areas of the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45: 699-707.

- McLaughlin, S.M., E. Elsayed y M. Faisal. 2000. Analysis of extracellular proteins of two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam *Mya arenaria* in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126: 587-598.
- McGoldrick, D.J. y D. Hedgecock. 1997. Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): implications for the causes of inbreeding depression. *Genetics*, 146: 321-334.
- Miossec, L., R.M. Le Deuff y P. Goulletquer. 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report No. 299. Copenhagen.
- Montes, J., M.A., Longa, A. Lama y A. Guerra. 1998. Marteiliosis of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) reared in Galicia NW Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 18: 124–126.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12: 527-534.
- Muranaka, M.S. y J.E. Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39: 217-228.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70:3321-3323.
- Nell, J.A. y J.E. Holliday. 1988. Effects of salinity on the growth and survival of Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*, 68: 39-44.
- Newell, R.I. 2004. Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *Journal of Shellfish Research*, 23: 51-62.
- Nicolas, L., M. Comps y N. Cochenec. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12: 11-13.
- Obeso-Nieblas, M., B. Shirasago-Germán, J. Gaviño-Rodríguez, E. Perez-Lezama, H. Obeso-Huerta y Á. Jiménez-Illescas. 2008. Variabilidad hidrológica en Bahía de La Paz, Golfo de California, México (1995-2005). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43: 559-567.
- Pace, D.A., A.G. Marsh, P.K. Leong, A.J. Green, D. Hedgecock y D.T. Manahan. 2006. Physiological bases of genetically determined variation in growth of marine invertebrate

- larvae: a study of growth heterosis in the bivalve *Crassostrea gigas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 335: 188-209.
- Padilla-Serrato, J., J. López-Martínez, J. Rodríguez-Romero, A. Acevedo-Cervante, F. Galván-Magaña y D. Lluch-Cota. 2017. Changes in fish community structures in a coastal lagoon in the Gulf of California, México. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 52: 567-579.
- Powell, E.N. , E.A. Bochenek, J.M., Klinck y E.E. Hofmann. 2002. Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. Aquaculture, 210: 89-117.
- Pereira, M. A., N.M. Nunes, L. Nuernberg, D. Schulz y C.R.V. Batista. 2006. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis-Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 159-163.
- Ponis, E., I. Probert, B. Veron, M. Mathieu y R. Robert. 2006. New microalgae for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Aquaculture, 253: 618-627.
- Ponis, E., G. Parisi, C. Zittell, F. Lavista, R. Robert y M.R. Tredici. 2008. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. Aquaculture, 282: 97-103.
- Ray, S.M. 1996. Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. Journal of Shellfish Research, 15: 9-11.
- Reeb, C.A. y J.C. Avise. 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Genetics, 124: 397-406.
- Rico-Villa, B., J.R. Le Coz, C. Mingant y R. Robert. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, 256: 377-388.
- Riviere, G., G.C. Wu, A. Fellous, D. Goux, P. Sourdain y P. Favrel. 2013. DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. Marine Biotechnology, 15: 739-753.
- Robert, R. y A. Gérard. 1999. Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. Aquatic Living Resources, 12: 121-130.

- Robert, R., G. Parisi, L. Rodolfi, B.M. Poli y M.R. Tredici. 2001. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 192: 333-346.
- Rodgers, C., I. Arzul, N. Carrasco y N.D. Furones. 2018. A literature review as an aid to identify strategies for mitigating ostreid herpesvirus 1 in *Crassostrea gigas* hatchery and nursery systems. *Reviews in Aquaculture*. 21: 1-21.
- Rodríguez-Quiroz, G., M. García-Ulloa, A.L. Domínguez-Orozco, T.N. Valenzuela-Hernández, E. Nava-Pérez, y A.M. Góngora-Gómez. 2016. Relación del crecimiento, condición y supervivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* y las variables ambientales, cultivado en suspensión en el sistema lagunar Navachiste-Macapule, Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51: 541-551.
- Rosa-Vélez, J. y F. Rodríguez-Romero. 1989. Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros: el caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Campeche. 225-284 p. En: Rosa-Vélez, J. y Rodríguez-Romero, F. (Eds.), *Temas Selectos de Oceanografía Biológica en México*. Ensenada, Baja California. México.
- Rosa-Vélez, J., M.T. Gutiérrez-Wing y R. Radilla-Camacho. 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, B.C., México: Aspectos genéticos. *Ciencias Marinas*, 17: 133-145.
- SAGARPA. 2018. Registro y Estadística Pesquera y Acuícola. Disponible en línea en: www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion (consultado el 21 agosto 2018).
- Samain, J.F. 2011. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquatic Living Resources*, 24: 227-236.
- Schikorski, D., N. Faury, J.F. Pepin, D. Saulnier, D. Tourbiez y T. Renault. 2011. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research*, 155: 28-34.
- Serrano, I. 1982. Variación estacional en la composición química de la ostra *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1790) cultivada en los canos de Guariquen. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente. Cumana, Venezuela.
- Sicard, M.T., A.N. Maeda-Martínez, S.E. Lluch-Cota, C. Lodeiros, L.M. Roldán-Carrillo, y R. Mendoza-Alfaro. 2006. Frequent monitoring of temperature: An essential requirement

- for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. *Aquaculture Research*, 37: 1040-1049.
- Smith, P.J. y A.M. Conroy. 1992. Loss of genetic variation in hatchery-produced abalone, *Haliotis iris*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 26: 81-85.
- Soto-Jiménez, M.F., F. Páez-Osuna, G. Scelfo, S. Hibdon, R. Franks, J. Aggarawl y A.R. Flegal. 2008. Lead pollution in subtropical ecosystems on the SE Gulf of California Coast: A study of concentrations and isotopic composition. *Marine Environmental Research*, 66: 451-458.
- Stoneking, M., D. Hedgecock, R. Higuchi, G. Vigilant y H.A. Erlich. 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American Journal of Human Genetics*, 48: 370-382.
- Tapia-Vázquez O., H.M. González-Alcalá, L.M. Saéñz-Gaxiola y R. Garcia-Hirales. 2008. Manual de buenas prácticas en granjas ostrícolas de San Quintin, Baja California, México. Comité de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California, A.C. (SAGARPA-CONAPESCA). Ensenada, México.
- Tervit, H. R., S.L. Adams, R.D. Roberts, L.T. McGowan, P.A. Pugh, J.F. Smith y A.R. Janke. 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology*. 51: 142-151.
- Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. 61-75 p. En: Lovatelli, A. Farías, A. y Uriarte, I. (Eds.), Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Actas de pesca y Acuicultura FAO. Puerto Montt, Chile
- Valdez-Holguín, J.E. 1994. Daily variations of temperature, salinity, dissolved oxygen and chlorophyll a, in a hypersaline lagoon of the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 20: 123-137.
- Van Oven, M. y M. Kayser. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30: 386-394.
- Villanueva-Fonseca, L.C. y C.M. Escobedo-Bonilla. 2013. Prevalencia del protozoario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41: 996-1002.

- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers y C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128: 219-240.
- Wright, J.M., y P. Bentzen. 1995. Microsatellites: genetic markers for the future. 117-121, p. En (Eds.) Gary R., I. Carvallo y J. Pitcher. *Molecular genetics in fisheries*. Chapman y Hall, Londres.
- Xu, L. Q. Li, H. Yu, y L. Kong. 2017. Estimates of heritability for growth and shell color traits and their genetic correlations in the black shell strain of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 19: 421-429.
- Yu, H. y Q. Li. 2007. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assessed by microsatellite markers. *Journal of Genetics and Genomics*. 34: 1114-1122.
- Zane, L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zhang, J., Q. Li, C. Xu y Z. Han. 2019. Response to selection for growth in three selected strains of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 503: 34-39.

IX. APENDICE

IX.1. Artículo de divulgación publicado en Panorama Acuícola Magazine.



Influencia de la variabilidad ambiental de la Laguna la Cruz (Sonora) en el crecimiento y condición del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

Investigadores de la Universidad de Sonora y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) Unidad Sonora estudiaron los efectos de la temperatura, salinidad, oxígeno, clorofila y seston (material diminuto que flota y nada en el agua, incluye los detritos y al plancton) sobre el crecimiento de ostiones *Crassostrea gigas* cultivados en la laguna La Cruz localizada en el estado de Sonora, México.

POR: FELIPE DE JESÚS REYNAGA-FRANCO, JORGE CHÁVEZ-VILLALBA, RAMÓN HÉCTOR BARRAZA-GUARDADO, EDGAR ALCÁNTARA-RAZO, JOSÉ ALFREDO ARREOLA-LIZÁRRAGA, REINA CASTRO-LONGORIA Y JOSÉ MANUEL GRIJALVA-CHON *

Los moluscos en la acuicultura

Los moluscos son el tercer grupo de interés acuícola en el mundo, solamente superados por los cultivos de peces y de crustáceos; dentro de los moluscos destacan los bivalvos y en particular el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), también conocido como ostión

japonés, que es la ostra más cultivada en el mundo (FAO, 2018). La especie se distingue por un rápido crecimiento, una amplia tolerancia a diversas condiciones ambientales y buena resistencia contra patógenos, esto ha propiciado que la especie se cultive prácticamente en todos los mares del mundo

(Diederich *et al.*, 2005). China es el principal productor mundial de esta especie aportando más del 80% de la producción mundial, luego le siguen Japón, la República de Corea, Francia y Estados Unidos de América (EUA) (FAO, 2016). En este último país, el cultivo del ostión del Pacífico genera 227 millones

En México la tasa de crecimiento para el ostión del pacífico es una de las más rápidas en el mundo. Y se ha reportado que el crecimiento de la especie está relacionado con variables ambientales, particularmente con la temperatura y la disponibilidad de alimento.

de dólares al año y más de 15,000 empleos (FAO, 2018).

En México, la especie se introdujo en San Quintín, Baja California, como una alternativa para diversificar la acuicultura en el país (Rosa-Vélez *et al.*, 1991). Los primeros cultivos se realizaron a partir de semilla importada de los EUA y fueron cultivadas en postas rústicas, pero actualmente existen diversos laboratorios de producción de semilla en el noroeste de México (Chávez-Villalba, 2014). En México la tasa de crecimiento para la especie es una de las más rápidas en el mundo, por ejemplo Castillo-Durán *et al.* (2010) mostraron que la especie crece 0.221 mm/día. Se ha reportado que el crecimiento de la especie está relacionado con las variables ambientales, particularmente con la temperatura y la disponibilidad de alimento (Chávez-Villalba *et al.*, 2007).

Las lagunas del Golfo de California presentan una alta variabilidad estacional, atribuida a la escasa precipitación y las altas temperaturas de la región (Arreola-Lizárraga, 2003). Algunas de estas lagunas son ecosistemas altamente productivos (Gómez-León *et al.*, 2018), particularmente la laguna La Cruz que se considera tiene la mayor productividad primaria del Golfo de California, pero con marcadas variaciones estacionales (Castro-Longoria *et al.*, 1991; Valdez-Holguín *et al.*, 1994; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2013). Aunque se ha evaluado la influencia de las condiciones extremas de temperatura de La Cruz sobre la expresión de genes del ostión del Pacífico (Valenzuela-Castillo *et al.*, 2015), se requiere más información de cómo esta productividad y variabilidad ambiental influyen en el crecimiento de la especie.

Tradicionalmente el crecimiento es el principal indicador de éxito en los cultivos de los bivalvos y para monitorearlo se emplean mediciones puntuales de la concha (alto, largo y ancho), así como la variación del peso total del organismo en diferentes intervalos de tiempo. No obstante, estas mediciones no permiten identificar patrones de crecimiento, ni identificar la influencia de las variables ambientales sobre el crecimiento de la especie en los cultivos comerciales. Una alternativa a las mediciones tradicionales es la implementación de la inferencia multimodelo, la cual permite identificar el mejor modelo y toma en cuenta variaciones estacionales para describir los patrones de crecimiento de la especie de interés (Chávez-Villalba y Aragón-Noriega, 2015; Góngora-Gómez *et al.*, 2017). Junto con el crecimiento, los índices




Spring Genetics

Spring Genetics, la única línea de tilapia con tolerancia a *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* en sus genes

Maneja la salud de tus peces desde el inicio

CONTACTOS

USA
usa@springgenetics.com
+1.786.548.8586

Brasil
brazil@springgenetics.com
+55.85.99922.3580
+55.85.99749.3375


A Benchmark Company

El objetivo de este estudio es analizar la influencia de la variabilidad ambiental de la laguna La Cruz en el crecimiento y la condición del ostión *C. gigas* durante un ciclo de cultivo.

de condición revelan el estado fisiológico de los organismos cultivados debido a que son afectados por los cambios estacionales de las variables ambientales y por eventos asociados a la reproducción (Gasmí *et al.*, 2017). Los índices brindan además información complementaria de interés a los productores ya que son indicadores de la calidad del producto que será comercializado.

Por otro lado, así como las variables ambientales, los patógenos son un factor limitante en el cultivo del ostión del Pacífico. Por ejemplo, el herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHv-1) y sus variantes, así como los protozoarios *Marteilia refringens* y *Perkinsus marinus* son los principales patógenos que afectan a la especie pudiendo producir altas mortalidades tanto en los cultivos como en los laboratorios de producción de semilla (Vázquez-Yeomans *et al.*, 2004, 2010; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008, 2012; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015; Grijalva-Chon *et al.*, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García



Fig 1. Localización del área de estudio y sistema de cultivo utilizado.

et al., 2017;). Estos patógenos están presentes en el Golfo de California y su proliferación está relacionada con las fluctuaciones de las variables ambientales. Las variaciones, particularmente cuando se llega a valores extremos (por ejemplo de temperatura), favorecen el estrés de los organismos en cultivo disminuyendo su capacidad de respuesta a procesos infecciosos (Fuhrmann

et al., 2018). El monitoreo continuo de patógenos es fundamental para tratar de mitigar su impacto en los cultivos comerciales.

Como se puede observar, la variabilidad ambiental de las lagunas influye en gran cantidad de procesos que afectan el desarrollo de los organismos, por lo que es importante documentar su influencia en el crecimiento de especies



Semilla de ostión japonés.

con interés comercial. Es por ello que el objetivo de este trabajo es analizar la influencia de la variabilidad ambiental de la laguna La Cruz en el crecimiento y la condición del ostión *C. gigas* durante un ciclo de cultivo.

Materiales y métodos del estudio

Se realizó la compra (siguiendo los protocolos convencionales) de un lote de 10,000 semillas de ostión del Pacífico en un laboratorio proveedor habitual de los ostricultores de la región. El lote se sembró el mismo día en que se recibió en un sistema tradicional de cultivo en la laguna La Cruz, Sonora. (Figura 1). El experimento se llevó a cabo durante casi 8 meses, con muestreos quincenales durante los primeros cinco meses y después con muestreos mensuales hasta el final del estudio.

La temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto fueron medidos en cada muestreo con una sonda multisensor YSI-85. Al mismo tiempo se colectó una muestra de un litro de agua para estimar la concentración de clorofila *a* y de sestón.

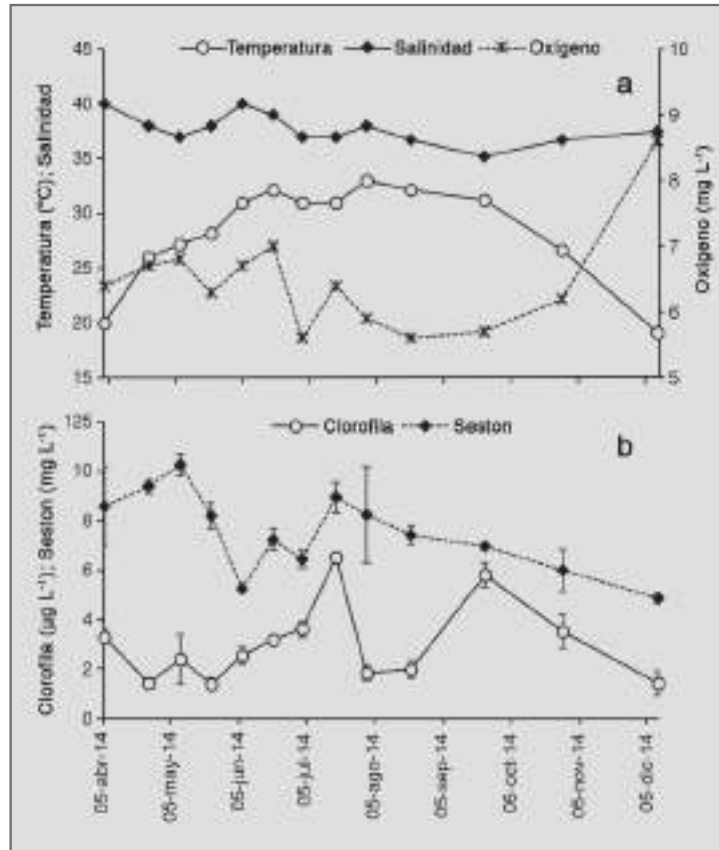


Fig 2. Valores de temperatura, salinidad y oxígeno; y de clorofila y sestón registrados en el sitio.

NUEVO

Presentamos LPB[®] Frozen Shellfish Diet[®]

* Larva, Post-Larva, Broodstock (Reproductores)

Más económico, conveniente, mayor vida en almacenaje

Crie bivalvos, camarones, y pepinos de mar más grandes y en mayor cantidad. Excelente suplemento nutricional y reemplazo de algas vivas para todas las etapas de desarrollo a partir del séptimo día. (Para los primeros días de alimentación de las larvas, use Reed Mariculture Shellfish Diet 1800[®]).

- Mezcla única de *Tetraselmis* sp., *Thalassiosira weissflogii* y *Thalassiosira pseudonana*
- Microalgas congeladas altamente concentradas
- Almacene congelado hasta 2 años

CICLO DE VIDA DEL CAMARÓN

ADULT REPRODUCTORS EGG NAUPLIU MYSIS ZOEA POST-LARVAE

PERIODO DE ALIMENTACION CON LPB

Reed Mariculture
EMBRACING THE BEST SUCCESS

MÁS INFORMACIÓN | ORDENE ONLINE: bit.ly/pa-lpb2



Así como las variables ambientales, los patógenos son un factor limitante en el cultivo del ostión del Pacífico. El monitoreo continuo de patógenos es fundamental para tratar de mitigar su impacto en los cultivos comerciales.

Los ostiones se cultivaron usando dos réplicas en un sistema en suspensión en cajas ostrícolas siguiendo los procedimientos (mantenimiento, limpieza, etc.) llevados a cabo por los productores de la región. En cada muestreo se seleccionaron al azar dos grupos (uno por cada réplica) de 50 organismos cada uno y se transportaron en hielo a la Unidad Experimental Kino de la Universidad de Sonora. A los organismos seleccionados se les revisó el estado de las valvas, después se lavaron con agua destilada y en caso de ser necesario se retiraron epibiontes con una espátula. Para determinar el crecimiento se registró la altura y el largo de la concha con un vernier digital, posteriormente cada ostión fue pesado en una balanza de precisión para obtener su peso total.

En este trabajo se evaluó el índice de condición considerando que

la etapa de semilla corresponde a una altura de concha entre 5 y 10 mm, y la etapa de juvenil y adulto corresponden a alturas mayores de 10 mm.

Para el análisis de patógenos se tomaron 100 semillas antes de la siembra y 30 ostiones adultos al final del período de cultivo. Todas las muestras se conservaron en etanol ($\geq 95\%$). En el caso de la semilla, estos se agruparon en lotes de cinco organismos (incluido el caparazón) para obtener un total de 20 lotes. Los procedimientos para detectar los patógenos fueron los mismos para semillas y adultos utilizando métodos reportados en la literatura que se pueden consultar en línea en la versión completa de este artículo (referencia al final del texto).

Resultados y discusión

La temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en el sitio de estudio

presentaron variaciones estacionales durante el cultivo experimental (Figura 2a). La temperatura promedio fue de 28.4 ± 4.5 °C, con valores máximos en agosto (33 °C) y mínimos en diciembre (19.1 °C). El promedio de salinidad fue de 37.7 ± 1.4 y los valores mostraron un patrón descendente de abril (40) a septiembre (35.2), para luego volver a incrementar hasta el final del estudio (37.5). El promedio de oxígeno fue de 6.4 ± 0.8 mg L⁻¹ con oscilación de sus valores entre 5.5 – 7 mg L⁻¹ y con un valor máximo de 8.6 mg L⁻¹ en diciembre. La temperatura y la concentración de oxígeno presentaron patrones inversos. Los valores mayores de temperatura coincidieron con las menores concentraciones de oxígeno, lo cual es común en las lagunas costeras del Golfo de California (Valdez-Holguín *et al.*, 1994; Páez-Osuna *et al.*, 2016). Por otro lado, todos los registros de

Pico de Supervivencia

DV AQUA® trabaja naturalmente con la biología de los peces para ayudar a mantener un sistema inmune fuerte.

Un sistema inmune fuerte promueve:

- La supervivencia y el rendimiento
- Una producción más eficiente
- La salud general y el bienestar

¡Apoyo inmune natural para todas las etapas de su vida!



DVAQUA

Diamond V
The Trusted Experts In Nutrition & Health

Circoite Balvanera # 5-A
Fracc. Industrial Balvanera
Corregidora, Qro | C.P. 70900 México
Teléfono: +52 442 183 7160

Para más información,
visite www.diamondv.com

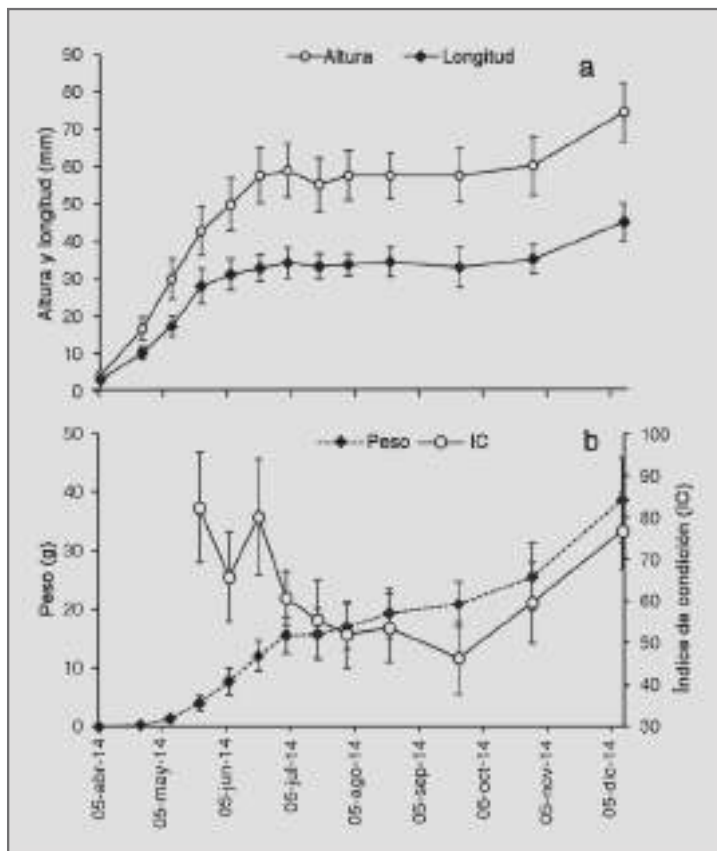


Fig 3. Variación de altura y longitud (a) y de peso e índice de condición (b).

En este trabajo se evaluó el índice de condición considerando que la etapa de semilla corresponde a una altura de concha entre 5 y 10 mm, y la etapa de juvenil y adulto corresponden a alturas mayores de 10 mm.

salinidad fueron mayores de 35, lo que indicó condiciones hipersalinas (Figura 2a). Se han reportado altas salinidades en las lagunas del noroeste de México debido a la alta tasa de evaporación (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Páez-Osuna *et al.*, 2016), lo cual está asociado a la profundidad y la tasa de renovación del agua en las lagunas (Bonilla *et al.*, 2005; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005).

La concentración de clorofila a mostró variaciones durante el cultivo experimental con dos picos principales, el mayor en junio ($6.5 \mu\text{g L}^{-1}$) y otro en septiembre ($5.9 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 2b). Este comportamiento es común en lagunas costeras subtropicales y son atribuidos principalmente a los eventos de surgencias marinas (Lara-Rodríguez *et al.*, 2015). La concentración de clorofila a durante el cultivo experimental no parece haber sido influenciada por algún otro parámetro del agua. Por otra parte, el seston presentó dos picos, el mayor en mayo (10.3 mg L^{-1}) con un descenso marcado en junio (5.2 mg L^{-1}), y luego otro en julio (8.9 mg L^{-1}) con descenso continuo hasta el final del estudio (Fig. 2b). No se observó correlación del seston con la clorofila, como ha sido reportado por Cervantes-Duarte *et al.* (2017) en la bahía de La Paz, Baja California Sur, que se encuentra también en el Golfo de California. El seston en la laguna La Cruz podría estar relacionado con los aportes de agua de las granjas camaronícolas y de los asentamientos humanos de Kino Viejo y Kino Nuevo hacia este cuerpo de agua. Lo anterior debido a que el seston se relaciona con aportes antropogénicos (Souchu *et al.*, 2010). En general, las variaciones estacionales, así como los valores de las variables ambientales del agua observados en este estudio coinciden con lo encontrado en reportes anteriores para este cuerpo de agua (Castro-Longoria



Semilla de ostión japonés.

Los resultados indicaron que el crecimiento de los ostiones cultivados estuvo fuertemente influenciado por la temperatura del agua.

et al., 1991; Valdez-Holguín, 1994; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2013). Con esto se demuestra que las condiciones ambientales no han presentado cambios significativos en los últimos años.

Desde el punto de vista acuícola, las concentraciones de clorofila a y de seston evidenciaron la disponibilidad de alimento para el ostión cultivado. Por ejemplo, se reportó por Lodeiros *et al.* (2018) un crecimiento óptimo de *C. gigas* alcanzando la talla comercial en menos de un año bajo concentraciones de seston (2.5-14.5 mg L⁻¹) similares a las de este estudio.

La talla promedio de altura de la concha durante la siembra fue de 4.2 ± 0.6 mm; posteriormente el crecimiento de los ostiones fue sostenido alcanzando un promedio de 57.7 ± 7.3 mm en junio (Figura 3a). Después el crecimiento prácticamente se detiene de julio a octubre, pero se reactiva durante diciembre alcanzando 74.5 ± 7.95 mm al final del experimento. Se observó el mismo patrón para la longitud de la concha, iniciando con una talla 1.8 ± 0.78 mm para la siembra y poste-

riormente con crecimiento continuo hasta junio (32.9 ± 3.6 mm) (Figura 3a). El crecimiento se mantiene relativamente constante de julio a octubre y se reactiva en diciembre alcanzando 45.3 ± 5.07 mm al final del cultivo. La sobrevivencia al término del cultivo experimental fue de 92.3% y la tasa promedio de crecimiento diaria se estimó en 0.292 mm/día (altura de concha).

Los resultados indicaron que el crecimiento de los ostiones cultivados estuvo fuertemente influenciado por la temperatura del agua. La relación entre temperatura y crecimiento ha sido reportada para el ostión del Pacífico en México y otros países del mundo (Castillo-Durán *et al.*, 2010; Gamain *et al.*, 2017; Góngora-Gómez *et al.*, 2017; Lodeiros *et al.*, 2018). En otras regiones, las temperaturas mayores a 20 °C se consideran no óptimas para el desarrollo de *C. gigas* (Samain *et al.*, 2005). No obstante, en este estudio la temperatura durante la siembra fue de 20 °C y luego aumentó gradualmente permitiendo un crecimiento sostenido de los organismos hasta junio cuando la temperatura llegó hasta

32.2 °C. Durante ese periodo la clorofila mantuvo valores promedio de 2.4 ± 0.8 µg L⁻¹ y se detectó el pico más importante de seston, sugiriendo que los ostiones tuvieron buena disponibilidad de alimento para soportar el crecimiento. No obstante, aún con abundante alimento disponible (picos de clorofila y seston) de julio a octubre, el efecto de temperaturas mayores a 30 °C durante este periodo detuvo el crecimiento de los organismos. Este comportamiento coincide con resultados anteriores donde el crecimiento de *C. gigas* se frena significativamente cuando se presentan las temperaturas máximas (Chávez-Villalba *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que en las lagunas del Golfo de California el rango óptimo para el desarrollo de la especie parece estar entre 20-30 °C debido a décadas de adaptación a las condiciones locales.

El peso promedio de las semillas durante la siembra fue de 0.1 mg, luego la ganancia en peso es continua hasta julio alcanzando 15.6 ± 3.1 g (Fig. 3b). Posteriormente, la ganancia en peso sigue aumentando, pero a una tasa menor hasta

SOLUCIONES MICROBIANAS CIENTÍFICAMENTE SELECCIONADAS PARA LA ACUICULTURA

SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS

Lallemand Animal Nutrition ofrece levaduras probióticas y bacterias y sus derivados para afianzar la salud y el rendimiento de todas las especies acuáticas cultivadas:

- Una gama completa de soluciones específicas que afectan la salud intestinal, la modulación inmunológica, el estado de los antioxidantes y la micronutrición.
- **LALSEA BIOREM AHORA ESTÁ DISPONIBLE EN MÉXICO:** Ayuda a mantener el equilibrio del agua del estanque.

Los demás productos están disponibles en todos los mercados de acuicultura asociados en todas las regiones.



La diferencia observada en las mediciones de peso en este estudio es que, debido a la disponibilidad de alimento, los ostiones canalizaron la energía para formar tejido en lugar de producir concha.

octubre (25.5 ± 5.6 g), para incrementar nuevamente y alcanzar 38.6 ± 7.2 g al final del estudio. Como se ha mencionado anteriormente, la disponibilidad de alimento durante el periodo de cultivo fue buena, no presentando restricciones para el adecuado desarrollo de los organismos. Por lo tanto, la disminución de ganancia en peso durante verano también se puede atribuir al efecto de las temperaturas más altas. Pero a diferencia de la concha, el peso total de los ostiones no se detiene sino que sólo disminuye, lo que sugiere que lo que sigue aumentando es el peso de la carne. El desacoplamiento entre el crecimiento de la concha y los tejidos ya se había reportado para la especie, pero en la mayoría de los casos ocurre que la concha sigue creciendo mientras que la ganancia en peso se retarda debido a poca disponibilidad de alimento (Brown y Hartwick, 1988). Este patrón también se detectó en ostiones cultivados dentro de la laguna La Cruz cuando se compara-

ron con ostiones cultivados fuera de ésta (Chávez-Villalba *et al.*, 2010).

La diferencia observada en este estudio es que, debido a la disponibilidad de alimento, los ostiones canalizaron la energía para formar tejido en lugar de producir concha. Esto también es un indicador de la adaptación de la especie a las condiciones ambientales locales y refleja una ventaja para los ostricultores, ya que los ostiones, aunque dejan de crecer no se “adelgazan” en verano y conservan buenas propiedades para su futura comercialización. Esta estrategia parece surgir después de años de adaptación de los ostiones, ya que aunque la especie tiene su origen natural en aguas templadas, su naturaleza euritérmica y eurihalina (Chávez-Villalba, 2014) le han permitido sobrevivir en las condiciones extremas de las lagunas del Golfo de California. Esta adaptación podría haber favorecido otros procesos como el de fijación de semilla en las lagunas, pero esto tiene que comprobarse en estudios futuros.

El índice de condición (IC) inició con valores altos (82.2 máximo) en mayo y junio para posteriormente disminuir gradualmente y llegar al valor más bajo en septiembre (46.4). Después vuelve a aumentar durante octubre y diciembre hasta alcanzar un valor de 76.8 al final del estudio (Fig. 3b). En general, el IC fue bueno durante todo el experimento debido a que los valores siempre permanecieron por arriba de 50 (excepto septiembre) con un promedio final de 63.2 ± 12.5 . La disminución del IC también correspondió al período de temperaturas altas y reducción de la tasa de ganancia en peso indicando que el verano-otoño es una fase crítica para los ostiones.

En general, todos los modelos de crecimiento probados en este estudio presentaron un buen ajuste a los datos, reflejando la viabilidad de implementar la inferencia multimodelo (IMM) como una alternativa para seleccionar el modelo que mejor describa el crecimiento de la especie. El crecimiento de la

especie y de los bivalvos en general puede ser muy variable dependiendo de las condiciones ambientales donde se desarrollen, por lo que se requieren técnicas como la IMM para encontrar el modelo que mejor describa el crecimiento, pero no se descarta la idea de encontrar un modelo universal para describir el crecimiento de los bivalvos, para lo que se requieren de más estudios en esta disciplina.

Los resultados de los análisis de patógenos indicaron que no se registró presencia de OshV-1, *Marteilia refringens* y *Perkinsus marinus*, ni en semilla antes de la siembra ni en adultos al final del cultivo. Estos patógenos han sido reportados en las lagunas del Golfo de California causando mortalidades tanto en los laboratorios de producción como en los cultivos comerciales (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Grijalva-Chon *et al.*, 2013, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2017). Desde la perspectiva de la sanidad acuícola se puede asumir que los protocolos para prevenir los patógenos en los laboratorios de producción de semilla están

dando buenos resultados. Por otra parte, si se considera las variaciones ambientales en el sitio de cultivo y la relación de éstas con la proliferación de patógenos (Solomieu *et al.*, 2015), podemos afirmar que el lote de semillas utilizado en este estudio presenta buena resistencia a enfermedades.

Conclusiones

La temperatura del agua influyó directamente en el crecimiento y la condición de los ostiones durante su cultivo. Durante los periodos más elevados de temperatura, los ostiones parecen adoptar una estrategia que les permite frenar el crecimiento de la concha y usar la energía proveniente del alimento para formar carne. El estrés que pudiera provocar los cambios extremos de los parámetros del agua no se vio reflejado en infecciones por patógenos a pesar de los múltiples reportes de patógenos asociados a bivalvos en La Cruz. Esto es un indicador de cultivos sanos, lo que contribuye a fortalecer la ostricultura de la región. Desde el punto de vista de la acuicultura, los resultados obtenidos indican un buen

desarrollo de los ostiones en cultivo, los cuales están dentro de los estándares de los cultivos comerciales en México. Los modelos de crecimiento fueron sensibles a las variaciones ambientales y su influencia en el crecimiento de los ostiones. Esto indica la importancia de emplear técnicas como la inferencia multi-modelo para describir más fielmente el crecimiento de los bivalvos. ^{©2020}

* Esta es una versión divulgativa del estudio publicado en 2019 por la Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud (Biotecnia) de la Universidad de Sonora en su volumen 21, número (2): Influencia de la variabilidad ambiental de la Laguna la Cruz (Sonora) en el crecimiento y condición del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*. Autoría de: Felipe de Jesús Reynaga-Franco, Jorge Chávez-Villalba, Ramón Héctor Barraza-Guardado, Edgar Alcántara-Razo, José Alfredo Arreola-Lizárraga, Reina Castro-Longoria y José Manuel Grijalva-Chon. Esta versión de Panorama Acuicola Magazine cubre puntos relevantes del mismo, sin embargo invitamos a nuestros lectores a consultar la publicación original y leer el estudio completo en: <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/issue/view/57>



a xylem brand

TÚ SIEMPRE TIENES UNA OPCIÓN

Usted tiene una opción en el monitoreo del proceso.

YSI ha estado desarrollando y fabricando instrumentos de monitoreo de la calidad del agua en los EUA durante 70 años.

Es hora de asociarse con YSI.



▲ IQ 2020 Controlador

APRENDA MÁS SOBRE CÓMO ASOCIARSE CON

☎ 877.926.9753 ✉ info@YSI.com
🌐 YSI.com/WW

xylem
Let's Solve Water