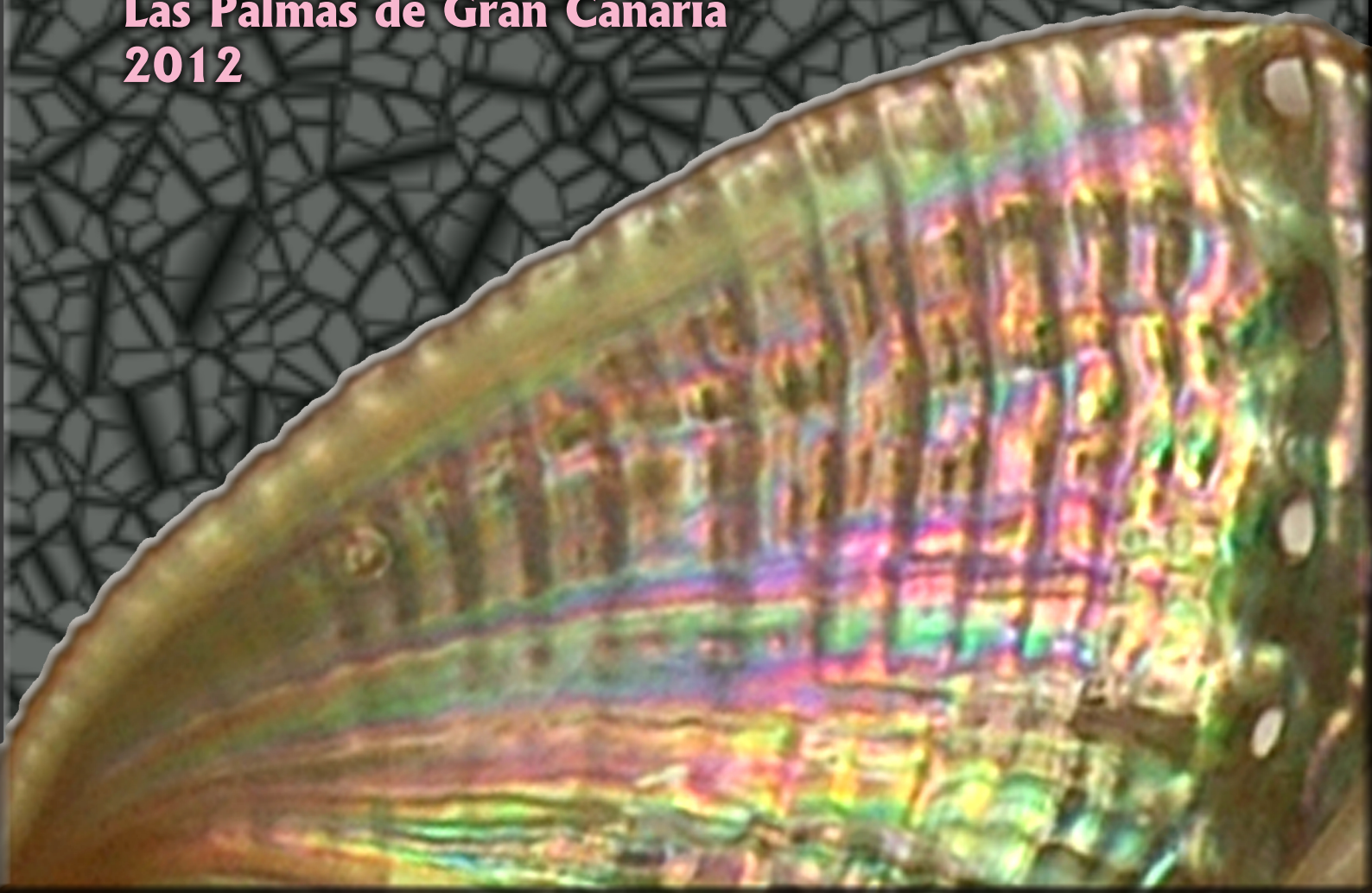


**Tesis Doctoral**

**Aspectos reproductivos y  
acondicionamiento de reproductores  
de *Haliotis tuberculata coccinea*  
(Reeve, 1846)**

**Amaia Bilbao Villena  
Las Palmas de Gran Canaria  
2012**





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



## Anexo I

**D<sup>a</sup> MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

### **CERTIFICA**

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 21 de diciembre de 2011 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“Aspectos reproductivos y acondicionamiento de reproductores de *Haliotis tuberculata coccínea* (Reveé, 1846)”**, presentada por la doctoranda D<sup>a</sup>. Amaia Bilbao Villena, dirigida por el Dr. D. Hipolito Fernández-Palacios Barber y Dr. D. Iker Uriarte Merino.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veintidós de diciembre de dos mil once.



**Anexo II**

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: Acuicultura: producción controlada de animales acuáticos

**Título de la Tesis**

**“Aspectos reproductivos y acondicionamiento de reproductores de *Haliotis tuberculata coccinea* (Reveé, 1846)”.**

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> Amaia Bilbao Villena

Dirigida por el Dr. D. Hipólito Fernández Palacios y por el Dr. D. Iker Gerardo Uriarte Merino.

El Director,

Hipólito Fernández Palacios

El Director,

Iker Gerardo Uriarte Merino

La Doctoranda,

Amaia Bilbao Villena

Las Palmas de Gran Canaria, a 28 de diciembre de 2011.



## TESIS DOCTORAL

# Aspectos reproductivos y acondicionamiento de reproductores de *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846)

---

Amaia Bilbao Villena

Grupo de Investigación en Acuicultura

Instituto Canario de Ciencias Marinas

Programa de Doctorado: Acuicultura: Producción controlada de animales acuáticos

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Las Palmas de Gran Canaria, a 2 de enero de 2012.



Nire gurasoentzat, Emilia eta José Elías





"Todas las verdades son fáciles de entender,  
una vez descubiertas. El caso es descubrirlas"

*Galileo Galilei*





# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1.LA PRODUCCIÓN DE LA PESCA Y DE LA ACUICULTURA	2
1.2.LA PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS	2
1.3.LA OREJA DE MAR	5
1.4.LA PRODUCCIÓN DE LA OREJA DE MAR	5
1.5.LA OREJA DE MAR CANARIA	8
1.6.ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA OREJA DE MAR	10
1.6.1. Descripción anatómica	10
1.6.2. Reproducción	12
1.6.3. Fases de desarrollo	15
1.6.4. Alimentación y crecimiento	16
1.6.5. Mortalidad	18
1.6.6. Patologías	18
1.7.EL CULTIVO DE LA OREJA DE MAR	20

1.8.ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES	21
1.8.1. Obtención de reproductores	22
1.8.2. Condiciones de cultivo	23
1.8.3. La inducción a la puesta y fertilización	27
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES</b>	<b>35</b>
3.1.TANQUES EXPERIMENTALES	36
3.1.1. Tanques de 60 l	36
3.1.2. Tanques de 1500 l	37
3.1.3. Tanques de 90 l	37
3.1.4. Tanques de 50 l	38
3.1.5. Cubetas de 2 l	38
3.1.6. Agua de mar	40
3.1.7. Aireación	40
3.2.CONDICIONES DE CULTIVO	40
3.2.1. Producción de alimento	40
3.2.2. Mantenimiento de los reproductores	41
3.3.TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	41
3.4.MÉTODOS ANALÍTICOS DE COMPOSICIÓN	41
3.4.1. Humedad	42
3.4.2. Ceniza	42
3.4.3. Proteínas	42

3.4.4. Lípidos	42
3.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS	43
3.6. INDUCCIÓN A LA PUESTA	45
3.6.1. Método de Peróxido de Hidrógeno	45
3.6.2. Método de Agua Irradiada con Radiación Ultravioleta	46
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>4.1. EXPERIMENTO I: Reproducción, Fecundidad y Crecimiento en el Medio Natural</b>	<b>51</b>
4.1.1. INTRODUCCIÓN	52
4.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	53
4.1.3. RESULTADOS	56
4.1.4. DISCUSIÓN	64
<b>4.2. EXPERIMENTO II: Alimentación durante el Acondicionamiento</b>	<b>67</b>
4.2.1. INTRODUCCIÓN	68
4.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	69
4.2.3. RESULTADOS	73
4.2.4. DISCUSIÓN	80
<b>4.3. EXPERIMENTO III: Eficiencia del Aceite de Clavo como Anestésico</b>	<b>87</b>
4.3.1. INTRODUCCIÓN	88
4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	89
4.3.3. RESULTADOS	90
4.3.4. DISCUSIÓN	93

<b>4.4. EXPERIMENTO IV: Control de Poliquetos en el Cultivo</b>	<b>95</b>
4.4.1. INTRODUCCIÓN	96
4.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	97
4.4.3. RESULTADOS	101
4.4.4. DISCUSIÓN	105
<b>4.5. EXPERIMENTO V: Control de la Reproducción</b>	<b>107</b>
4.5.1. INTRODUCCIÓN	108
4.5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	110
4.5.3. RESULTADOS	112
4.5.4. DISCUSIÓN	117
<b>5. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>123</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES</b>	<b>127</b>

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es consecuencia de mi paso por el Instituto Canario de Ciencias Marinas y recoge una pequeña parte del trabajo que he desarrollado durante muchos años. Durante este periodo de tiempo tengo que agradecer a muchas personas el apoyo que he recibido. Este apoyo a sido fundamental para crecer profesionalmente y como persona.

Mis primeras gracias se las voy a dar a mi director de tesis, a Pipo. Ha sido todo un placer estar bajo su supervisión, siempre de buen humor y dispuesto a echar una mano en cualquier momento. También quisiera agradecer el apoyo de mi co-director Iker Uriarte, que durante mi estancia en Chile, fue una persona que me acogió con mucho cariño y me dio la oportunidad de conocer más sobre el cultivo de la oreja de mar y las microalgas.

He tenido la fortuna de conocer a muchas personas muy lindas vinculadas al ICCM. Muchas gracias Mapi por darme la oportunidad de trabajar con la oreja de mar en el ICCM. Muchas gracias a las dos Desirés, a Vanesa, a Daniela y a todas las técnicas que pasaron por el cultivo de la oreja de mar. A las investigadoras Bea y Anastasia por su compañerismo y buenos ratos. A Gercende.

También quisiera agradecer su gran profesionalidad y colaboración a los técnicos de la nave que coincidieron conmigo Ada, Moneiba, Manolo, Damián, gracias por tantas ayudas y buenos ratos. En los análisis bioquímicos, a Carmen que sin ella esta tesis no hubiera sido posible y además, me ha encantado conocerla y a Yurena.

No me puedo olvidar de todos los becarios e investigadores de la nave. Muchas gracias a Tibi, Fran, Silvia, Alex, Juan Estefanel, Rachid, Eyad, Valeria, Eneko, Dominique, Javi Roo, Tatiana, Lahoussine, Monica y Fefi y otros más que hacen que una profesión sea un placer.

A los senior del GIA... muchas gracias a Carmen Hernández que me ha corregido un montón de cosillas super rápido y todos sus consejos han sido muy válidos, a Marisol Izquierdo por todo su APOYO (en letras mayúsculas), a Juan Socorro por su buen humor y por ensayarme las técnicas de histología al comienzo de todo... muchos años!... A Daniel, Lucia, Lidia y María José por su cordialidad y muchos conocimientos... de ahí la palabra senior claro!

Quisiera agradecer al Departamento de Pesquería del ICCM, en especial a Víctor Tuset por ayudarme con los datos de la población natural y también al profesor Jorge Núñez del Departamento de Zoología de la Universidad de La Laguna por ayudarme a identificar los gusanos. Ha sido todo un placer conocerlos Víctor y Jorge. Y muchas gracias también a Ricardo Haroum que aceptó ser mi director para la suficiencia investigadora.

Igualmente agradecer a todo el personal que paso por la administración del ICCM: Tere, Roberto, Mabel etc. Gracias a Eulogia, María y Tere que mantienen el centro como los paños del oro y además por los buenos ratos y ánimos en los pasillos. Y como no, a todo el personal de seguridad, en especial a Martín y Cristina, que con los años compartidos son buenos amigos. Y no me puedo olvidar de Miguel que siempre ha estado disponible para solventar cualquier problema.

Gracias a mis amigos de cada día, en especial a Valeria, Kike, Nani, Mikel, Luigi y Mila por compartir tantos deseos e ilusiones.

Sin duda este proyecto no se podía haber llevado a cabo sin las siguientes dos personas, Emilia y José Elias, que desde siempre me han dado su amor y apoyo INCONDICIONAL. Mila esker ama eta aita. También agradecer a mis hermanos, Iratxe, Maider y Asier que los quiero un montón y que es una suerte tenerlos en la familia.

Y por último y para mí los más importantes a Dabi y Aritz. A Dabi por ser esa persona tan especial que es imposible de conocer y no querer, el mejor compañero de viaje. Y a mi niño Aritz, que me derrito cuando lo veo. Ellos llenan mi vida.

ESKERRIK ASKO!!

## RESUMEN

El presente trabajo, tiene como objetivo principal ampliar el conocimiento existente sobre el manejo de reproductores, y la reproducción de *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846), especie considerada candidata potencial para diversificación de la acuicultura en Canarias.

El Experimento I, se basa en el estudio de la reproducción y crecimiento de una población natural, para ello veinte ejemplares de *Haliotis tuberculata coccinea* fueron capturados mensualmente, entre junio del 2005 y mayo del 2007, del medio natural, en la isla de Gran Canaria. Se utilizaron técnicas histológicas con el propósito de investigar el ciclo reproductivo, y se estimaron los parámetros de crecimiento de von Bertalanffy. La morfología del ovario, reveló la existencia de seis estados de células germinales femeninas en el proceso oogénico, y un desarrollo ovárico por grupos sincrónicos. El ciclo reproductivo fue caracterizado como anual a lo largo de todo el año, aunque la máxima actividad reproductiva se observó entre agosto y febrero. La fecundidad varió entre 85.749 huevos (29 mm en longitud de concha) y 691.456 huevos (62 mm en longitud de concha). Se observó una fecundidad significativamente superior en las hembras superiores a 55 mm en longitud de concha, sugiriendo que esta es la talla mínima de reproductores que se debe utilizar en un criadero, para optimizar la producción de huevos. En relación a la estructura de la población, el ratio de machos respecto a hembras fue de 1:1,02, y el análisis de clases de tamaños no reveló ninguna tendencia en los datos. Los parámetros de von Bertalanffy estimados para hembras y machos fueron de 72,5 y 78 mm en longitud de concha, y una tasa de crecimiento de 0,43 y 0,37 año<sup>-1</sup> respectivamente.

El Experimento II, se centró en el efecto de la calidad del alimento, sobre el perfil de ácidos grasos de las gónadas, sobre algunos aspectos reproductivos (la morfología de la gónada y la viabilidad de puestas inducidas), y sobre parámetros fisiológicos (tasas de crecimiento y alimentación) en adultos de *Haliotis tuberculata coccinea*. Los individuos fueron alimentados con dietas constituidas por macroalgas (*Gracilaria cornea* Agardh, 1852) de diferente contenido proteico, designadas como Low-N, Medium-N e High-N *G. cornea*. Después de inducir la puesta, el mayor número de huevos expulsados por gramo de animal, y los mayores diámetros de huevos y de citoplasma, fueron encontrados en los individuos que se alimentaron con las dietas Medium-N y High-N *G. cornea*. Se observó, que la alimentación con la dieta High-N *G. cornea*, aumentó el contenido del ácido Araquinódico en las gónadas maduras de *Haliotis tuberculata coccinea*. Asimismo, el estudio histológico de la gónada reveló



que el estado maduro de individuos alimentados con Low-N *G. cornea*, tuvo una mayor cantidad de poblaciones de macrófagos y las áreas de oocitos degeneradas fueron más frecuentes. El presente experimento sugirió que las macroalgas cultivadas en agua enriquecida con amonio, puede ser una buena opción para alimentar las hembras reproductoras de *Haliotis tuberculata coccinea* en Canarias.

El Experimento III, trata sobre la utilización de anestésicos en la manipulación de los reproductores. Se probó la eficacia del aceite de clavo como anestésico, en las tareas rutinarias en una granja, en ejemplares entre 42 – 80 mm en longitud de concha. El aceite de clavo fue comparado con el anestésico habitualmente utilizado en el cultivo de oreja de mar, 2-fenoxietanol. El aceite de clavo fue mezclado previamente al 50 % con etanol absoluto y se testaron cuatro concentraciones: 0,1 ml/l, 0,3 ml/l, 0,5 ml/l y 0,7 ml/l. Para evaluar la eficacia de los anestésicos se consideraron los tiempos de relajación y de recuperación, la condición del músculo y la mortalidad. Los resultados mostraron que 0,5 ml/l de aceite de clavo fue la menor concentración que desprendió todos los individuos de sus refugios en  $8,9 \pm 3,5$  minutos, con un tiempo de recuperación de  $2 \pm 1,5$  minutos. En comparación con el 2-fenoxietanol, el aceite de clavo fue efectivo en una dosis 10 veces menor.

En el Experimento IV, se identificó al poliqueto que afectó el cultivo de *Haliotis tuberculata coccinea*, en el Instituto Canario de Ciencias Marinas en 2008, y además evaluó la eficacia de la aplicación de dosis múltiples de mebendazol para controlar dicha infestación. El mebendazol fue aplicado en forma de baños con el producto denominado comercialmente lomper® (Laboratorio Esteve, España), en las siguientes concentraciones: 6 ml/l, 8 ml/l y 10ml/l, asimismo se utilizó 0 ml/l como control. Las orejas de mar infestadas fueron expuestas a tres baños de mebendazol, aplicados en tres días consecutivos (un baño de tres horas cada día), como se recomienda en las instrucciones del medicamento, para su uso en humanos. Después de cada baño, las orejas de mar se mantuvieron en los tanques de cultivo hasta el próximo baño. Cada mes, debido al efecto del mebendazol, los poliquetos moribundos y/o muertos se desprendieron de sus madrigueras en las conchas de la oreja de mar, y se encontraron en el fondo de los tanques, en los siguientes quince días a la aplicación de los baños de mebendazol. Estos poliquetos fueron contabilizados, recolectados y fijados en formaldehído al 10 % para su posterior identificación. Todo este proceso se repitió cada mes, hasta que no aparecieron más poliquetos en el fondo de los tanques, después de la aplicación de los baños de mebendazol. La especie de poliqueto fue identificada como *Polydora hoplura* (Claparède, 1870). La eficacia del lomper® fue aproximadamente de un 99 % en todas las concentraciones ensayadas, cuando fue aplicado durante siete meses consecutivos (cada mes, se aplicaba un baño durante tres días consecutivos). La mortalidad de las orejas de mar, ocurrió solamente en los animales muy

infestados. El estudio de crecimiento durante el experimento, sugirió que el tratamiento con mebendazol no afectó significativamente el peso del animal.

El Experimento V, del presente trabajo, se centró en un estudio sobre el acondicionamiento de un lote de reproductores de *Haliotis tuberculata coccinea*, proveniente del medio natural y estabulado en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas, sin modificar la temperatura del agua, y alimentados con una dieta mixta de algas. El objetivo fue la determinación del potencial reproductor de esta especie en cautividad. Se estudió histológicamente el índice gonadosomático y se comparó con el visual, con el propósito de determinar el momento adecuado para inducir la puesta y el potencial reproductor (i.e. fecundidad, número de hembras que alcanzan la madurez, respuesta a la inducción al desove, número de puestas etc.) a lo largo de un año, induciendo la puesta cada mes. Además se realizó un experimento para determinar la concentración idónea de espermatozoides para obtener el mayor porcentaje de fertilización. Si bien se obtuvieron puestas inducidas a lo largo de todo el año, no todos los reproductores acondicionados respondieron satisfactoriamente a las condiciones de cultivo, ni a la inducción a la puesta. Este hecho sugiere la importancia de realizar una selección de reproductores, para minimizar el trabajo y los costes que implican las tareas de acondicionamiento en un criadero. El momento más adecuado para inducir la puesta en *Haliotis tuberculata coccinea* fue cuando los reproductores estuvieron en un estado de desarrollo gonadal 3 (determinado visualmente), sin embargo, este estado no aseguró la puesta inducida. Los resultados mostraron que *Haliotis tuberculata coccinea* es una especie desovadora parcial y que requirió entre dos y cuatro meses de acondicionamiento para volver a responder satisfactoriamente a la inducción a la puesta. No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre la fecundidad y la talla del animal (longitud de concha). La concentración óptima de espermatozoides a la cual se obtuvo un mayor porcentaje de fertilización, y un mayor porcentaje de desarrollo larvario normal, fue de  $10^4$  espermatozoides/ml.



## ABSTRACT

The main objective of the present work is to expand the existing knowledge about conditioning and reproduction of *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846), a species considered a potential candidate for the local aquaculture diversification in the Canaries.

The Experiment I is based on a study of the reproduction and growth of *Haliotis tuberculata coccinea* in a natural population for this, twenty monthly samples were collected during June 2005 and May 2007 at Gran Canaria Island. Histological techniques were used to investigate the reproductive biology and, von Bertalanffy growth parameters were estimated. The ovary morphology revealed six stages of female sexual cells in oogenetic process and an ovaric development by group synchronous. The reproductive cycle was characterized as an annual spawning throughout the year, although the maximum reproductive activity of population was between August and February. Batch fecundity ranging from 85,749 eggs (39 mm in shell length) to 691,456 eggs (62 mm in shell length) and significantly highest fecundity was found in individuals over 55mm shell length, suggesting that this is the minimum broodstock size to be used in hatcheries to optimize egg production. Related to population structure, the overall sex ratio of males to females was 1:1.02 and the analysis by size class did not reveal a tendency in data. The von Bertalanffy parameters estimated for females and males were 72.5 and 78.8 mm SL of asymptotic length and, 0.43 and 0.37 years<sup>-1</sup> of growth rate.

The Experiment II focuses on the effect of the quality of food on the fatty acid profile of the gonads, on some reproductive aspects (the morphology of the gonad and the viability of spawning) and on physiological parameters (growth and feeding rates) in adult *Haliotis tuberculata coccinea* females. Abalones were fed on macroalgae diets (*Gracilaria cornea* Agardh, 1852) with three different protein levels, namely Low-N, Medium-N and High-N *G. cornea*. After inducing the spawning, the higher number of eggs released per gram of abalone and the biggest egg and cytoplasm diameters were found in abalones fed on Medium-N and High-N *G. cornea* diets. Feeding High-N *G. cornea* increased the level of Arachidonic acid in the mature gonad tissue in *Haliotis tuberculata coccinea*. Likewise, a histological study on the gonadal morphology revealed that ripe-stage individuals fed on a Low-N *G. cornea* diet had a higher amount of macrophage populations and the areas of degenerated oocytes increased. The present study suggests that macroalgae cultivated in seawater enriched with ammonium may be a good choice for producing food for female *Haliotis tuberculata coccinea* broodstock in the Canaries.

The Experiment III discusses the use of the anaesthetics in the manipulation of broodstock. We evaluated the effectiveness of clove oil as an anesthetic in routine tasks on a farm, and we evaluated in specimens from 42 - 80 mm in shell length. The efficacy of clove oil was compared with the anaesthetic commonly used in the cultivation of abalone, 2 - phenoxyetanol. The clove oil was previously mixed at 50% with absolute ethanol and four different concentrations were tested: 0.1 ml/l, 0.3 ml/l, 0.5 ml/l and 0.7 ml/l. Relax and recovery time, muscle condition and mortality after one week was consider to evaluating the efficiency of anaesthetics. The results showed that clove oil at 0.5 ml/l was the lowest concentration that removal all abalone from the rearing shelters in  $8.9 \pm 3.5$  minutes, showing  $2 \pm 1.5$  minutes of recovery time. In comparison with 2-phenoxyethanol, clove oil was effective in 10-fold lower doses.

In the Experiment IV, we identified the shell-boring polychaetes that affected in 2008 the cultivation of *Haliotis tuberculata coccinea* in the Instituto Canario de Ciencias Marinas. We also evaluated the effectiveness of the implementation of multiple doses of mebendazole for controlling this pest. Mebendazole was applied as baths of lomper® (Esteve Laboratory, Spain) using the following concentrations: 6 ml/l, 8 ml/l and 10 ml/l and, 0 ml / l as a control measure. Abalones were exposed to 3 mebendazole baths over a three-day period (1 x three-hour bath applied for three consecutive days), as recommended in the drug directions for human use. After each bath, the abalones were returned to their original culture tanks until the following day. After these three days, the abalones were kept in their original culture tanks for a term of one month. Each month, due to the effect of mebendazole, moribund and/or dead polychaetes became detached from the burrows and were found at the bottom of the tanks during the first 15 days after the baths of mebendazole were applied. The polychaetes expelled from the shells were counted, collected and fixed in 10% buffered formaldehyde for the subsequent identification. This process was repeated month after month until no moribund and/or dead shell-boring polychaete was found at the botton of the tanks after the application of the baths of mebendazole. The shell-boring polychaete species was identified as *Polydora hoplura* (Claparède 1870).The efficacy rate of lomper® was around 99 % in all the concentrations tested when it was applied during a seven-month term (each month, 1 bath was applied for 3 consecutive days) and, abalone mortality was limited to highly-infested animals only. Monitoring of abalone weight gain suggested that the mebendazole treatments did not affect growth significantly during the study period.

The Experiment V of this work focuses on the conditioning of a *Haliotis tuberculata coccinea* batch captured in the natural environment and stabled in the facilities of the Instituto Canario de Ciencias Marinas, without changing the water temperature and fed on a mixed algae

diet. The objective consisted of determining the reproductive potential of this species in captivity. A histological study of the gonadosomatic index was carried out and it was compared with the visual estimation of this index, in order to determine the most appropriate moment to induce spawning and the reproductive year-round potential (i.e. fecundity, number of females reaching maturity, response to spawning induction, number of spawning events) by inducing spawning on a monthly basis. Likewise, an experiment was conducted to determine the concentration of sperm necessary to get the best fertilization rate. Although induced spawning events occurred throughout the year, not all the conditioned broodstock responded satisfactorily to the culture conditions or to the induction of spawning either. This fact suggests the importance of the broodstock selection so as to minimize the work and costs involved in the hatchery and related to the conditioning tasks. According to the results obtained, the best moment to induce *Haliotis tuberculata coccinea* spawning was the period of time when individuals reached the stage 3 of the gonad index (visually determined). However, this stage did not ensure a successful spawning. The results showed that *Haliotis tuberculata coccinea* is a partial-spawning species and between two and four months were required so as to obtain again a satisfactory response to the spawning induction. No relationship, statistical significant, between the fecundity rate and the animal size (i.e. shell length) was found. The optimal sperm concentration with which a higher fertilization rate and a higher percentage of normal larval development were obtained were  $10^4$  spermatozooids/ml.



## LISTA DE TABLAS

<b>Table 1</b> Criteria used to assess gonad development stage	55
<b>Table 2</b> Proximate composition and caloric content of the experimental diets	73
<b>Table 3</b> Mean shell length and daily increase in shell length	74
<b>Table 4</b> Mean body weight, specific growth rate and weight gain	74
<b>Table 5</b> Feeding rate, mean of total feed intake and protein efficiency ratio	75
<b>Table 6</b> Proximate composition of animals (viscera, muscle and gonad)	76
<b>Table 7</b> Fatty acid composition of the experimental diets	77
<b>Table 8</b> Fatty acid composition of gonad tissue of <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	78
<b>Table 9</b> Maximum diameter of egg and maximum diameter of the egg cytoplasm	80
<b>Table 10</b> Details of the anaesthetic treatments tested as muscle relaxants	89
<b>Table 11</b> Response of <i>Haliotis tuberculata coccinea</i> to the anaesthetics	91
<b>Table 12</b> The initial amount of polychaetes, efficacy rate of lomper® and mortality	103
<b>Table 13</b> Specific growth rate and weight gain of 60 – 79 mm in shell length of animals	104
<b>Table 14</b> Specific growth rate and weight gain of 40 – 59 mm in shell length of animals	104
<b>Table 15</b> Response of <i>Haliotis tuberculata coccinea</i> to the spawning induction	115





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Producción mundial de moluscos marinos por grupos de especies en 2008	3
<b>Figura 2</b>	Producción europea de moluscos por grupos de especies en 2008	4
<b>Figura 3</b>	Producción mundial de la oreja de mar en el periodo 1970 - 2008	6
<b>Figura 4</b>	Producción mundial de acuicultura de la oreja de mar por países en 2008	7
<b>Figura 5</b>	Ejemplar silvestre de <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	9
<b>Figura 6</b>	Estructura externa, aparato digestivo y sistema nervioso de la oreja de mar	12
<b>Figura 7</b>	Morfología del ovario de la oreja de mar	13
<b>Figura 8</b>	Desarrollo embrionario y larvario de <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	15
<b>Figura 9</b>	Post-larva de <i>Haliotis tuberculata coccinea</i> a la edad de 25 días	17
<b>Figura 10</b>	Tanques de 60 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas	36
<b>Figura 11</b>	Tanques de 1500 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas	37
<b>Figura 12</b>	Tanques de 90 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas	39
<b>Figura 13</b>	Tanques de 50 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas	39
<b>Figura 14</b>	Cubetas de 2 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas	39
<b>Figure 15</b>	Location of sampling area of abalone specimens from the Canary Islands	53
<b>Figure 16</b>	Slides of ovarian <i>Haliotis tuberculata coccinea</i> tissue	58
<b>Figure 17</b>	Monthly changes in the percent frequency of the maturity stages	59
<b>Figure 18</b>	Seasonal variation of the gonad bulk index box plot	60
<b>Figure 19</b>	Seasonal variation of the oocytes diameter box plot	60
<b>Figure 20</b>	Oocyte size frequency distributions in ripe gonads	61
<b>Figure 21</b>	Relationships between batch fecundity and shell length and body weight	62
<b>Figure 22</b>	Batch fecundity according to shell length of ripe females	62

<b>Figure 23</b> Size frequency distribution by sex	63
<b>Figure 24</b> Length-weight relationship for males and females	63
<b>Figure 25</b> Means of surface water temperature in Castillo del Romeral Bay	65
<b>Figure 26</b> Three experimental diets	70
<b>Figure 27</b> The viability of spawning of <i>Haliotis tuberculata coccinea</i> females	79
<b>Figure 28</b> Representative ripe-stage ovary structures of <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	81
<b>Figure 29</b> An animal released from the shelter due to the clove oil effect	90
<b>Figure 30</b> Relaxation time box plot in anaesthetic treatments used	92
<b>Figure 31</b> Recovery time box plot in anaesthetic treatments used	92
<b>Figure 32</b> Shell of a highly infested abalone of the control group	99
<b>Figure 33</b> Typical chimneys of <i>Polydora hoplura</i>	102
<b>Figure 34</b> Typical blisters of <i>Polydora hoplura</i>	102
<b>Figure 35</b> Number of shell-boring polychaetes expelled after 3 baths of mebendazole	103
<b>Figure 36</b> Shells of <i>Haliotis tuberculata coccinea</i> after the treatment of mebendazole	105
<b>Figure 37</b> The stage 3 of visual gonad index in <i>Haliotis tuberculata coccinea</i>	111
<b>Figure 38</b> Percentage of the different stages of oocytes for each visual gonad index	113
<b>Figure 39</b> The relationship of the ovarian area and the 3 stages of visual gonad index	113
<b>Figure 40</b> Monthly changes in the percentage of the 3 stages of visual gonad index	114
<b>Figure 41</b> Relationship between sperm concentration and percentage of fertilization	116
<b>Figure 42</b> Relationship between sperm concentration and percentage of normal larvae	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

**mm** milímetro

**ml** mililitro

**l** litro

**MMt** millones de toneladas

**t** toneladas

**m** metro

**cm** centímetro

**Kg** kilogramo

**PSP** Paralytic Shellfish Poison

**ICCM** Instituto Canario de Ciencias Marinas

**ULPGC** Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

**IUSA** Instituto de Sanidad Animal

**GIA** Grupo de Investigación en Acuicultura

**µm** micrómetro

**EAT** effective accumulative temperature

**mg** miligramo

**g** gramo

**UV** ultravioleta

**nm** nanómetro

**PVC** policloruro de vinilo

**cv** caballos fiscales

**ANOVA** análisis de la varianza

**MS** maturity stages

**GBI** gonad bulk index

**EMS** percentage frequency of the maturity stages

**OD** oocyte diameter

**Og** oogonia

**Oc<sub>1</sub>** stage 1 oocyte

**Oc<sub>2</sub>** stage 2 oocyte

**Oc<sub>3</sub>** stage 3 oocyte

**Oc<sub>4</sub>** stage 4 oocyte

**Oc<sub>5</sub>** stage 5 oocyte

**N** number of samples

**SEM** standard deviation

**DISL** daily increase in shell length

**SGR** specific growth rate for weight

**WG** weight gain

**MTFI** mean of total feed intake

**FR** feeding rate

**PER** protein efficiency ratio

**GE** gross energy

**Kcal** kilocalorie

**SL** shell length

**BW** body weight

**FA** fatty acid

**AA** Arachidonic acid

**EPA** Eicosapentaenoic acid

**DHA** Docosahexaenoic acid

**PUFA** polyunsaturated fatty acids

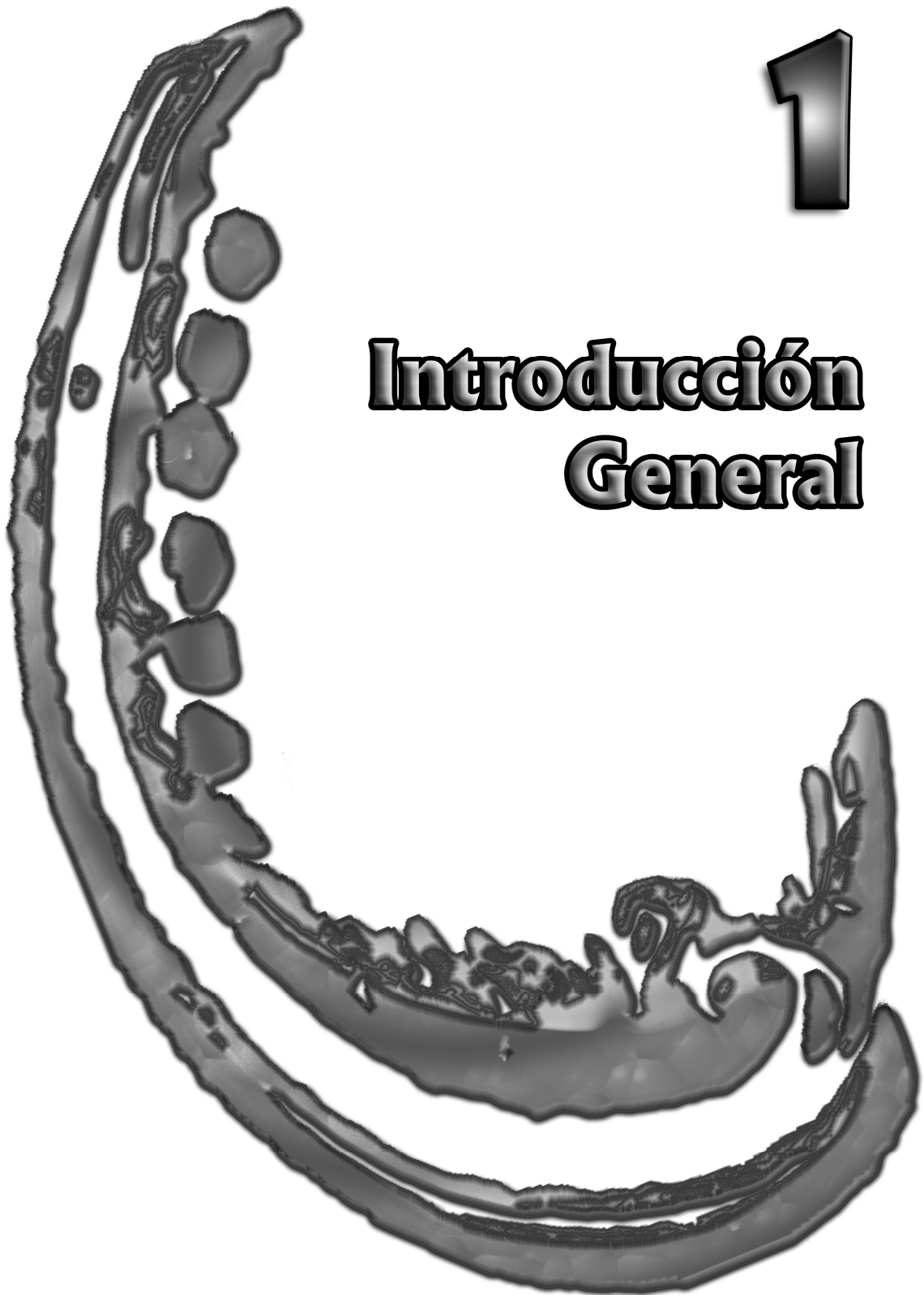
**HUFA** polyunsaturated fatty acids with 20 or more carbon atoms

**EF** efficacy rate

**VGI** visual gonad index

**1**

# **Introducción General**



## **1.1. LA PRODUCCIÓN DE LA PESCA Y DE LA ACUICULTURA**

La pesca y la acuicultura son una fuente crucial de ingresos, y medio de subsistencia para cientos de millones de personas en todo el mundo, y el porcentaje de incremento del empleo en el sector en ambos sectores aumenta más rápidamente que la tasa anual de crecimiento de la población mundial, y que el porcentaje de empleo en la agricultura tradicional.

Según APROMAR (2011), la pesca y la acuicultura suministraron al mundo en 2009 unos 163 millones de toneladas (MMt) incluyendo peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos, de ellos, 139 MMt se destinaron al consumo humano. Cabe destacar, que mientras que las capturas de la pesca se ha mantenido en un nivel en torno a los 90 MMt desde 2001, la producción de la acuicultura ha tenido un fuerte incremento, con una tasa media anual de crecimiento, desde el 2001 del 6,2 % y ha alcanzado 73 MMt en 2009, suministrando el 52,9 % de la producción mundial de productos acuáticos destinado al consumo humano.

## **1.2. LA PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS**

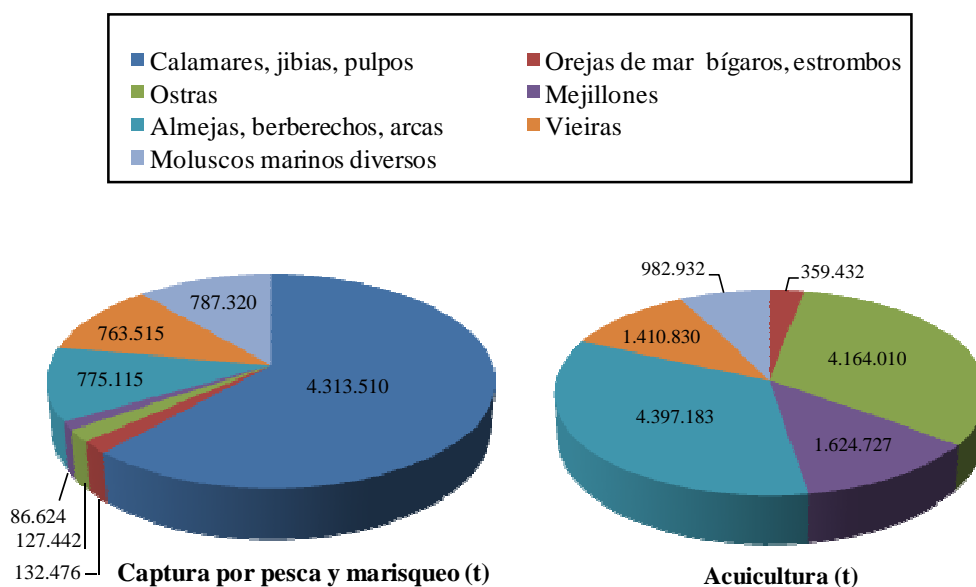
### **En el mundo**

En 2008, la acuicultura produjo 13,1 MMt de moluscos, y la captura por pesca y marisqueo fue de 7,3 MMt (FAO, 2010). Los principales grupos de especies se muestran en la Figura 1, se observa el predominio de calamares, jibias y pulpos (4.313.510 toneladas, t) en capturas, y el predominio de almejas, berberechos y arcas (4.397.183 t) seguido por ostras (4.164.010 t) en acuicultura. Asia fue el principal continente productor de moluscos en acuicultura (11.877.246 t, de las que un 87 % pertenecen a China), le siguieron Europa (657.960 t), América (435.571 t), Oceanía (119.465 t) y África (2.373 t).

### **En Europa**

Según la FAO (2011), la producción total de moluscos europea fue de 1.103.230 t en 2008, de las cuales, la acuicultura produjo 657.960 t mientras que la captura por pesca y marisqueo fue de 427.270 t (Figura 2). El principal país en capturas de moluscos fue Reino Unido (76.089 t), seguido por Francia (72.229 t), Italia (59.970 t) y España (51.715 t). España lideró la captura de calamares, jibias y pulpos (40.575 t), y le siguieron Italia, Francia y Portugal con un total conjunto de 65.148 t. Dinamarca lideró la captura de mejillón (35.082 t), y los principales países de captura de vieiras fueron Francia y Reino Unido con un total de 56.551 t. Las almejas, berberechos y arcas se capturaron mayoritariamente en Francia (27.062 t), Reino

Unido (15.371 t) y España (10.092 t). Francia y Reino Unido, así mismo, lideraron las capturas de orejas de mar, bígaros y arcas (13.851 y 12.196 t respectivamente). La ostra fue la especie que menos se capturó y fueron Irlanda y Dinamarca, los principales países productores (2.256 y 1.490 t respectivamente).

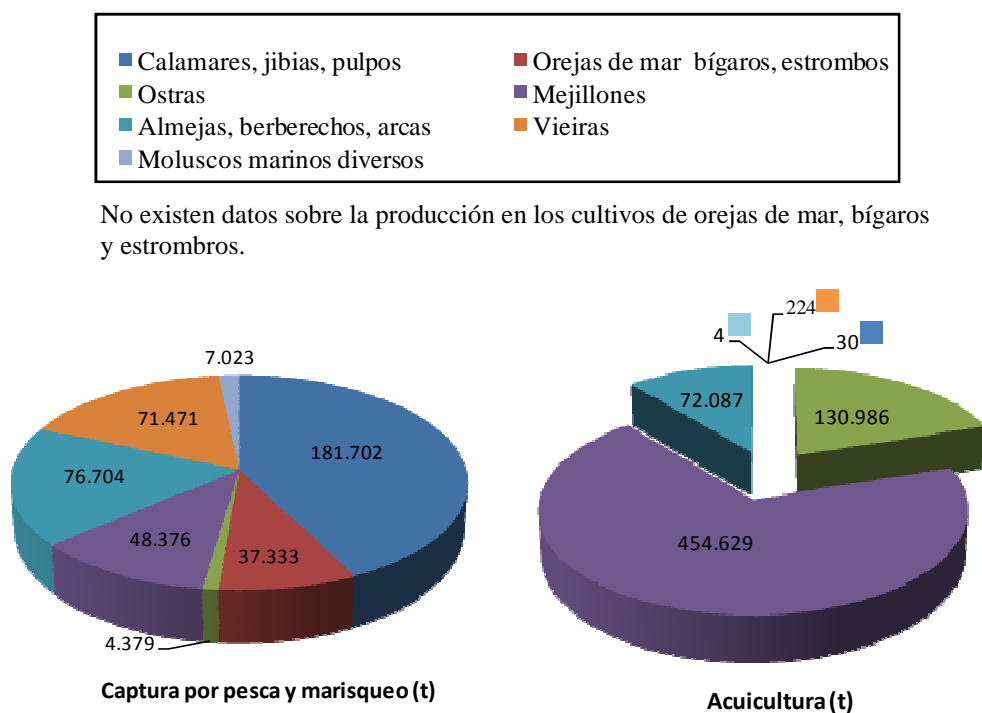


**Figura 1** Producción mundial de moluscos marinos por grupos de especies en 2008 (FAO, 2011).

Según FAO (2011), los mejillones (*Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*) son los principales moluscos producidos por la acuicultura europea, con un total de 454.629 t, principalmente en España (180.265 t), Francia (72.760 t) e Italia (61.200 t). Cabe destacar, el incremento de la producción en países como Irlanda, Grecia y Reino Unido (con un total de 86.825 t, en conjunto), mientras que un país con gran tradición en el cultivo del mejillón, como es Holanda, ha visto su producción reducida en los últimos tiempos debido a las dificultades para conseguir semilla. La ostra fue el segundo molusco producido, la especie mayoritariamente cultivada fue la gigas (*Gassostrea gigas*), aunque también se produjeron otras dos especies más la ostra plana y el ostión (*Ostrea edulis* y *Crassostrea angulata*). El primer país productor fue Francia (112.960 t), aunque se están sumando otros países como Irlanda, que entre 1999 y 2008 pasó de producir 1.700 a 8.000 t. La almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), ocupó el tercer lugar con una producción en 2008 de 72.087 t, Italia fue el principal productor aportando 61.800 t, Francia España y Reino Unido produjeron en conjunto un total de 8.100 t. En menor



cantidad se produjo la vieira (*Pecten maximus*) con un total de 224 t de los cuales Irlanda y Reino Unido aportaron un total de 102 t.



**Figura 2** Producción europea de moluscos marinos por grupos de especies en 2008 (FAO, 2011).

### En España

Según JACUMAR (2009), en 2008 la producción española de acuicultura alcanzó 265.298 t de las cuales, 65.262 y 199.923 t correspondieron a peces y a moluscos respectivamente y 113 t a crustáceos. La mayor producción de la acuicultura española corresponde a moluscos, especialmente al mejillón (*Mytilus edulis*) con un 72,69 % de la producción total. Cabe destacar las bruscas variaciones de su producción en los últimos años, en función de los episodios de mareas rojas que tienen lugar en Galicia, pero a pesar de ello, España continúa estando entre los primeros países productores con 180.265 t producidas en el año 2008. En la cornisa Cantábrica y la región Noroeste, se ha desarrollado el cultivo del mejillón y ostras en bateas, y el de almejas y berberechos en parques de cultivo. Como cultivos secundarios se pueden destacar el de pectínidos y de forma emergente, el engorde de pulpo. En la zona Mediterránea y Suroccidental de aguas más templadas también tienen cierta importancia el cultivo de ostras, almejas y mejillón. En Canarias y Baleares, no se realiza el cultivo de moluscos a nivel comercial.

### 1.3. LA OREJA DE MAR

La oreja de mar es el nombre común, con el que se denomina a las especies pertenecientes a la clase Gastropoda (Cuvier 1797), orden Archeogastropoda (Thiele 1929), familia Haliotidae (Rafinesque 1815) y su a único género *Haliotis*. El primer haliótido conocido aparece en el Cretácico (hace aproximadamente 65 millones de años) en la actual California. Hoy en día, se distribuyen en todos los océanos (Lindgerg, 1992), batimétricamente se localizan en profundidades por encima de los 30 m donde las algas, su alimento natural, crecen abundantemente (FAO, 1990).

Si bien existen 56 de especies de oreja de mar (Geiger, 2000), sólo alrededor de 15 tienen interés comercial (Hanh, 1989). Entre ellas, cabe destacar en Asia, la kuro (*Haliotis discus*) que es una oreja de mar de tamaño grande y considerada de gran calidad debido a su exquisito sabor, y la donkey's ear abalone (*Haliotis asinina*) y tokobushi (*Haliotis diversicolor*), que son orejas de mar pequeñas (hasta 10 cm en longitud de concha) y de crecimiento rápido (Cook y Gordon, 2010). En otros lugares del mundo, las especies comerciales incluyen al blacklip abalone (*Haliotis rubra*) y greenlip abalone (*Haliotis laevigata*) en Australia, paua (*Haliotis iris*) en Nueva Zelanda, perlemoen abalone (*Haliotis midae*) en Sudáfrica, red abalone (*Haliotis rufescens*) en México y Estados Unidos y green abalone (*Haliotis fulgens*) en Estados Unidos, todas ellas orejas de mar de gran tamaño (entre 20 y 30 cm en longitud de concha) (Hanh, 1989).

Toda la carne de la oreja de mar es comestible, pero tradicionalmente el consumo primario es el del músculo del pie. Su carne es fileteada en las especies de mayor tamaño, y el resto es utilizado por muchos restaurantes para hacer sopas y otros platos preparados. En Japón se consideran "delicatesen" las gónadas, cuando se comen inmediatamente después de separar la concha de la carne en las orejas de mar vivas. En el mercado internacional se puede encontrar la oreja de mar: fresca, enlatada, congelada e incluso seca. Además, también se comercializa su concha, ya que posee un color irisado muy adecuado para la creación de abalorios y adornos.

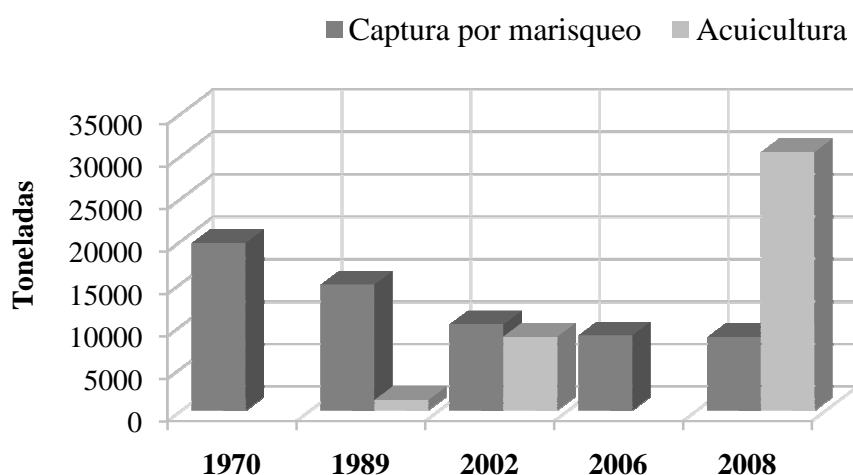
### 1.4. LA PRODUCCIÓN DE LA OREJA DE MAR

#### En el mundo

Mientras la producción mundial de moluscos aumentó a un ritmo anual del 3,7 %, entre los años 2000 y 2008, la producción de orejas de mar aumentó a un ritmo anual del 39,9 %, desde una producción de 2.800 t en el año 2000 hasta 39.000 t en el año 2008 (FAO, 2010). La

captura por marisqueo aportó aproximadamente 9.000 t, mientras que la acuicultura aportó 30.000 t (Cook y Gordon, 2010).

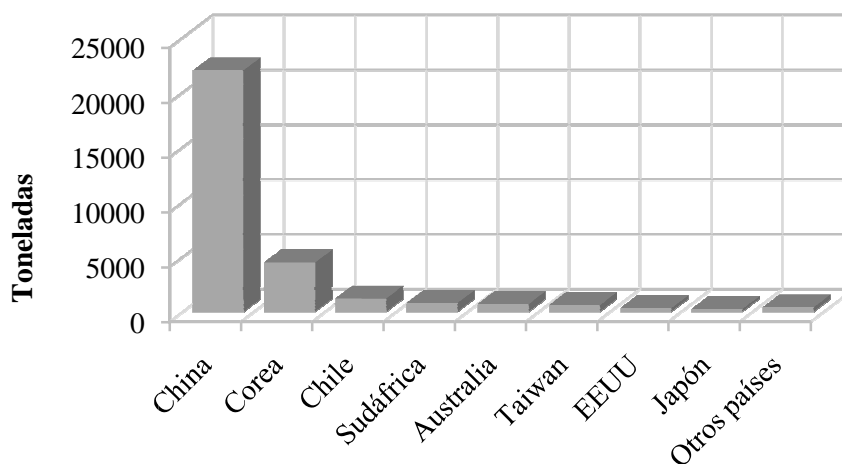
La captura mundial por marisqueo disminuyó gradualmente desde las 20.000 t en 1970 hasta las 9.000 t en 2008 (Figura 3), y esta disminución se debió principalmente: a la sobreexplotación de las poblaciones naturales, la captura ilegal (en 2008 supuso un 60 % de la captura total), las enfermedades y la degradación del hábitat (Cook y Gordon, 2010). Es más, por estas razones dos de las mayores zonas marisqueras (Estados Unidos y Sudáfrica) se encuentran actualmente vedadas. En 2008 las mayores capturas por marisqueo se realizaron en: Australia (5.000 t), Nueva Zelanda (1.500 t), Japón (1.200 t) y México (750 t).



**Figura 3** Producción mundial de la oreja de mar en el periodo 1970 - 2008 (Cook y Gordon, 2010).

Por el contrario, a medida que el volumen de capturas por marisqueo disminuye, el cultivo a nivel mundial ha experimentado un aumento de un 350 % en un periodo de 6 años, con una producción total de unas 30.000 t en 2008 (Figura 3) (Cook y Gordon, 2010). El principal productor es China (Figura 4), donde se estima que existen 300 empresas con una producción de 23.000 t en 2008. Las principales especies cultivadas en China son el small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*), como especie de bajo valor comercial, y un híbrido de *Haliotis discus hannai* y *Haliotis discus discus* como especie "premium". La mayoría de la producción de China se queda en el país. Corea es el segundo productor mundial, y se estima que su producción ha aumentado 60 veces en los últimos 9 años, con un total de 4.500 t en 2008, procedentes de empresas pequeñas y no muy desarrolladas tecnológicamente. La principal especie cultivada es

el ezoawabi (*Haliotis discus hanna*), y el 85 % de la producción se exporta a Japón. En el resto de países productores de oreja de mar, la mayoría de la producción (marisqueo y acuicultura) se destina a unos pocos países asiáticos, principalmente Japón, China y Tailandia (Cook y Gordon, 2010).



**Figura 4** Producción mundial de acuicultura de la oreja de mar, por países, en 2008 (Fishtech, 2008).

El incremento de un 350 % de la producción de la acuicultura, y el aumento en la disponibilidad de orejas de mar procedentes de la captura ilegal, ha resultado en una disminución de su precio en los últimos años. Actualmente, el precio del producto fresco de las especies de menor tamaño (ej. *Haliotis diversicolor*) es de 15 US\$ / kg, y las especies premium mucho más grandes (ej. *Haliotis laevigata* y *Haliotis discus*), alcanzan un valor de 30 US\$ / kg (Cook y Gordon, 2010) cuando en 1999 tenían un valor de 45 US\$ / kg (Gordon y Cook, 2001).

### En Europa

La industria de la oreja de mar europea se basa principalmente en la especie *Haliotis tuberculata*, con nombres vulgares tales como ormer en Irlanda, seeohr en Alemania y ormeau en Francia. Esta especie se captura tradicionalmente en la costa oeste de Francia y en las Islas del Canal de La Mancha (dependientes de la Corona Británica) (Huchette y Clavier, 2004). La producción total (marisqueo y acuicultura) se incrementó a principios de los años 90, debido a la globalización del mercado internacional y a un aumento en las exportaciones a Asia. Sin embargo, las capturas por marisqueo han sufrido variaciones a lo largo de los años, debido principalmente a la sobreexplotación de los stocks naturales en las Islas de Canal de La Mancha,

a la infección de la especie bacteriana *Vibrio carchariae* en Francia, y a las toxinas paralizantes PSP (Paralytic Shellfish Poison), producidas por los microorganismos de las “mareas rojas” en España (Huchette y Clavier, 2004).

La producción de la acuicultura europea se estima en aproximadamente 150 t anuales (González y Malo de Molina, 2002). Irlanda introdujo y comenzó la producción de las especies *Haliotis tuberculata* y *Haliotis discus hannai* en la década de los 70, y junto a las Islas del Canal de La Mancha, lideran hoy en día la producción europea (Huchette y Clavier, 2004). En Francia se cultiva *Haliotis tuberculata*, destinada principalmente a cubrir las demandas de los restaurantes parisinos (Huchette y Clavier, 2004). En Europa, la mayor parte de la producción se destina a Francia, donde la producción local no abastece la demanda (González y Malo de Molina, 2002).

### **En España**

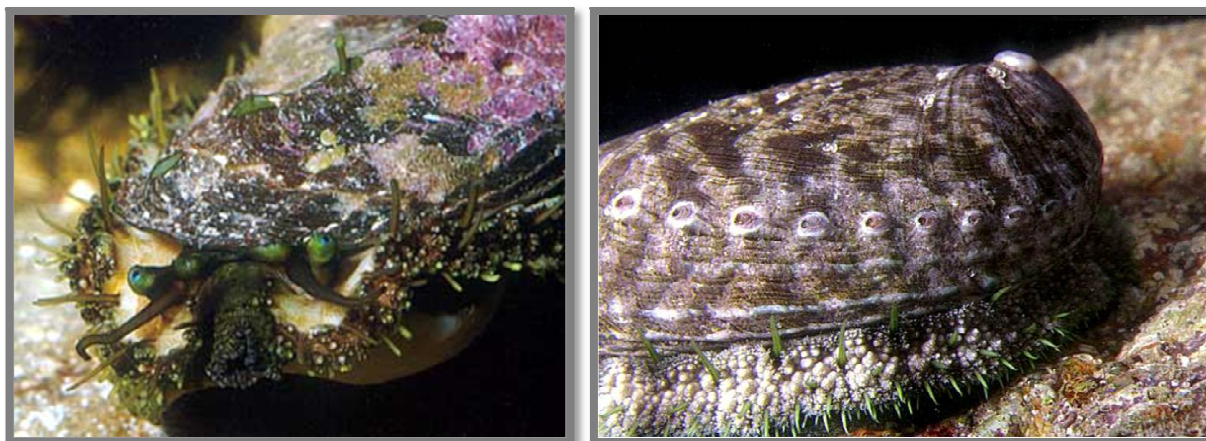
Según González y Malo de Molina (2002), la producción española de oreja de mar se ha centrado en Galicia mediante su marisqueo, y surge como consecuencia de su atractivo precio en los mercados asiáticos a principios de la década de los 90. Sin embargo, a partir de 1993, esta actividad permaneció paralizada nueve años debido a la presencia de la toxina PSP en las rías gallegas. Desde esa fecha sólo tres cofradías realizaron la extracción de *Haliotis tuberculata*, aunque varias más contaban con planes de explotación. La forma de comercialización de la oreja de mar consistía en subastar previamente, en lonja, una determinada cantidad y fijar un precio mínimo, a partir del acuerdo entre el mariscador y los compradores. Una vez fijados el precio y la cantidad, se realiza la extracción. Desde diciembre de 2005, en todos los análisis realizados se vuelve a superar los límites legales de contenido en PSP, lo que impide su comercialización. En el presente año, 2011, la empresa Galician Marine Aquaculture S.L. tiene previsto comenzar a cultivar en Galicia las especies *Haliotis tuberculata* y *Haliotis discus hannai* (especie introducida).

## **1.5. LA OREJA DE MAR CANARIA**

La oreja de mar presente en Canarias se conoce popularmente como almeja canaria, lapa burra u orejón. En realidad, es una sub-especie de *Haliotis tuberculata* (especie autóctona de Europa) y su nombre científico es *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846) sinonimia de *Haliotis coccinea canariensis* (Nordsieck, 1975) (Moro *et al.*, 2003) (Figura 5).

Su distribución geográfica es Macaronésica, aunque se han encontrado algunos ejemplares en Melilla y Málaga (Geiger, 2000). En Canarias, la almeja canaria es una especie ubiquista y muestra una gran selección por el hábitat; aparece en pedregales formados por

rocas de tamaños medianos y recubiertos por algas rojas calcáreas incrustantes, entre 0 - 15 m de profundidad, formando durante el día parte de la comunidad infralapidícola, adheridas a las piedras por su cara inferior (Núñez *et al.*, 1994).



**Figura 5** Ejemplar silvestre de *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846). Izquierda: detalle del rostro y de los tentáculos paleales en los orificios de la concha. Derecha: detalle del epipodium con tentáculos táctiles y línea de orificios en la superficie de la concha (Anónimo, [www.google.com](http://www.google.com)).

Es una oreja de mar de talla pequeña, con un máximo de 7 cm en longitud de concha (Espino y Herrera, 2002), y en Canarias, debido a su exquisito sabor, ha sido considerada un manjar sobre todo en la Isla de Tenerife, donde se ha centrado casi exclusivamente la tradición marisquera de este molusco (Núñez *et al.*, 1994). En Canarias, se consume todo el cuerpo y se cocina con la concha en paellas, a la plancha con mojo verde o al horno condimentada con ajo, perejil y zumo de limón (Ossorio, 1982).

Los primeros estudios sobre el estado de las poblaciones canarias de *Haliotis tuberculata coccinea*, se realizaron en 1994 y 1995 (Núñez *et al.*, 1994, 1995). En dichos estudios se observó que las poblaciones en todo el Archipiélago se encontraban sobreexplotadas, sobre en todo en la isla de Tenerife. Se consideró entonces, que las capturas debían realizarse sobre ejemplares con una talla mínima de 35 mm en longitud de concha, e instaurar un periodo de veda y un número máximo de capturas por mariscador, además de una serie de medidas excepcionales para la isla de Tenerife, que incluían la prohibición total del marisqueo, al menos en los dos años siguientes a los estudios anteriormente mencionados.

En el año 2002, se evaluó de nuevo el estado de las poblaciones en todo el Archipiélago (Espino y Herrera, 2002), y se observó que, la mayoría de las poblaciones poseían una talla media por debajo de la primera talla de reproducción, y además se encontraban en estado de

regresión. Este hecho se debía principalmente a dos razones: por una parte, a la fuerte degradación de las costas canarias (con numerosos vertidos de todo tipo y edificaciones), sobre todo en el caso de Gran Canaria y Tenerife, y por otra a la gran presión marisquera en todas las islas excepto en El Hierro y en La Palma. En aquella época la almeja canaria se cotizaba a 48 € / kg.

Desde el año 2001 esta especie se encuentra en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (BOC-2001/097; BOE-2011/043). Es entonces cuando el Gobierno de Canarias se interesa en desarrollar su cultivo, y el Grupo de Investigación en Acuicultura (ICCM-ULPGC), con la financiación de varios proyectos nacionales y europeos, realiza experiencias de inducción a la puesta (Peña, 1986), cultivo larvario (Courtois de Vicose *et al.*, 2007, 2010; Courtois de Vicose, 2011) y engorde (Toledo *et al.*, 2000; Viera *et al.*, 2005, 2011). Estas experiencias han demostrado la viabilidad de su cultivo y la potencialidad comercial del mismo.

## **1.6. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA OREJA DE MAR**

### **1.6.1. Descripción anatómica**

La descripción anatómica se ha realizado de acuerdo a FAO (1990), y Pérez y Moreno (1991).

La característica más llamativa del género *Haliotis* es la forma de la concha, similar a la de una oreja. El color de la concha depende en gran medida del tipo de roca en que habite y de las algas que componen su dieta (FAO, 1995; Liu *et al.*, 2009), y es el resultado de la adaptación y evolución de la especie como mecanismo de defensa contra la depredación en el medio natural (Liu *et al.*, 2009). La concha contiene una espira corta formada por tres o cuatro vueltas, de las cuales la última es muy amplia y presenta una serie de orificios redondeados u ovales, alrededor de los cuales la superficie de la concha se eleva ligeramente (Figura 5). Por cada orificio aflora al exterior un tentáculo paleal, el cual funciona como poro respiratorio y canal de excreción de desechos, y de liberación de huevos y esperma. A medida que el animal crece, se forman nuevos orificios, mientras que los más antiguos situados en la parte posterior se sellan con carbonato cálcico. *Haliotis tuberculata coccinea* presenta 5 o 6 poros abiertos. La superficie de la concha presenta crestas con forma de espiral, donde las estrías de crecimiento son apreciables. La abertura oblicua, es muy amplia y el labro se encuentra ligeramente dentado. La superficie interna de la concha contiene un grueso estrato de nácar.

La característica ventral más llamativa es el músculo del pie. La parte dorsal del pie está rodeada lateralmente por un collar llamado epipodium, el cual contiene pequeños órganos

sensoriales y tentáculos especializados, que permiten un contacto sensorial químico y táctil con el medio que rodea al animal (Figura 5). La parte ventral del pie tiene la capacidad de contraerse fuertemente y aparece con elevada mucosidad, de esta forma, la oreja de mar es capaz de adherirse fuertemente a las rocas u otras superficies duras. La parte anterior del pie es la cabeza e incluye la boca, dos ojos y dos tentáculos cefálicos largos con capacidad para retraerse (Figura 5).

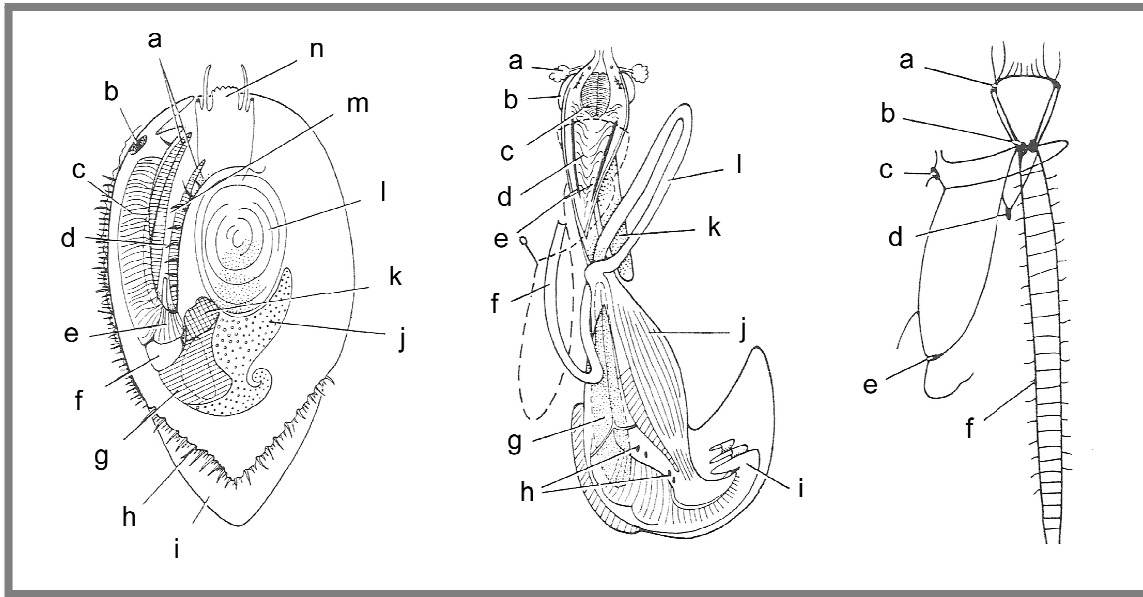
El aparato digestivo se encuentra en la parte izquierda del músculo aductor, localizado en la mitad del cuerpo (Figura 6). Los órganos digestivos consisten en la lengua, tráquea, estómago, intestino recto y el ano. Debido a la forma espiral del cuerpo, los órganos del digestivo aparecen curvados, y la lengua y el ano se encuentran en la misma orientación. La lengua tiene forma ovalada y en ella se encuentran el lóbulo de calyx, la rádula y las glándulas salivares. La tráquea del abalón es larga y estrecha. El estómago tiene forma de V y se encuentra posterior a la tráquea. El hígado (hepatopáncreas) está localizado en la parte derecha del músculo aductor, protuberante y con forma de cuerno de buey. El intestino que finaliza siendo el recto, comienza en la parte trasera hacia la parte marginal delantera rodeando la parte izquierda del músculo aductor. El intestino mide aproximadamente 3,27 veces la concha. Las heces y otros materiales de desecho se liberan a través de los poros respiratorios mediante contracciones del músculo del pie.

El sistema nervioso está poco desarrollado (Figura 6). Contiene cinco pares de ganglios (cerebral, pedal, ventral, branquial e intestinal) y una conjunción de nervios que están conectados longitudinal y transversalmente.

El aparato respiratorio presenta dos branquias localizadas inmediatamente debajo de los poros de la concha y funcionan como órganos respiratorios (Figura 6). Se encuentran en el centro de la cámara respiratoria, y la de la derecha es más grande que la de la izquierda. La parte izquierda y el fondo de la cámara respiratoria está cerrada, de esta forma, el paso del agua hacia las branquias se realiza desde la parte superior y derecha. El agua de mar pasa a través de las branquias (intercambio gaseoso) y se dirige hacia los poros respiratorios de la concha junto con otros productos de excreción procedentes del ano.

En el aparato circulatorio (Figura 6), el corazón, localizado en la cavidad pericardial, consta de un ventrículo y dos aurículas. La sangre desde el corazón se transporta a través de las venas situadas entre los órganos por el sistema circulatorio, primero se dirige hacia las arterias de las branquias y una vez oxigenada, llega a la aurícula a través de las venas branquiales.





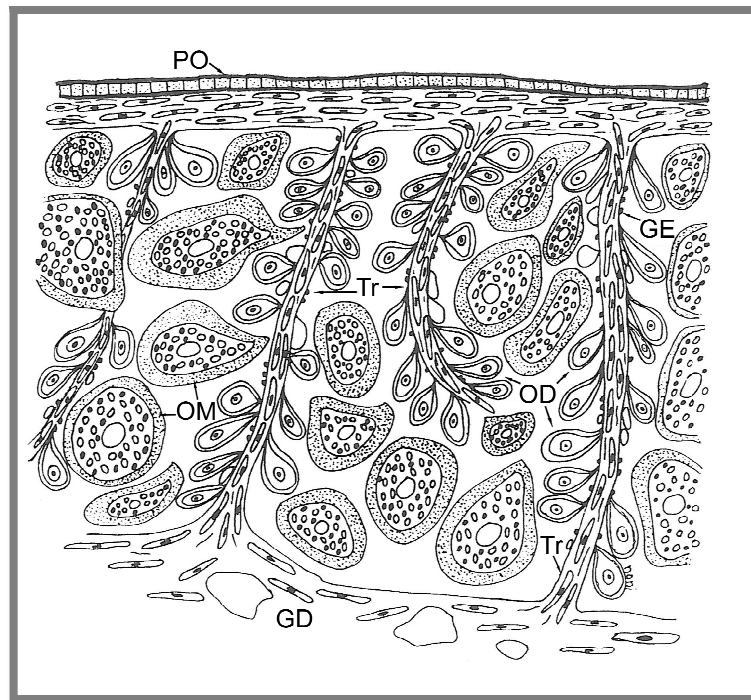
**Figura 6** Estructura externa, aparato digestivo y sistema nervioso de la oreja de mar. Izquierda: Estructura externa donde (a) ctenidium (b) músculo de la concha izquierdo (c) branquia izquierda (d) tentáculos paliales (e) branquia derecha (f) pericardio (g) glándula digestiva (h) epipodium (i) pie (j) gónada (k) órgano renal derecho (l) músculo de la concha derecho (m) ranura paleal (n) boca con lengua. Centro: Aparato digestivo donde (a) glándula salivar (b) bolsa bucal (c) rádula (d) esófago anterior (e) apertura hacia la bolsa del esófago (f) recto (g) protostyle (h) aperturas del divertículo del digestivo hacia el estómago (i) caecum gástrico (k) saco radular (l) intestino. Derecha: Sistema nervioso donde (a) ganglio cerebral (b) ganglio pleural (c) ganglio parietal izquierdo (d) ganglio parietal derecho (e) ganglio visceral (f) cordones pedales (modificado de Packard, 1981).

### 1.6.2. Reproducción

La oreja de mar es dioica, es decir, presenta sexos separados, aunque se han encontrado casos aislados de animales hermafroditas, relacionados con la contaminación por metales pesados en el agua (Cochard, 1980; Girard, 1972; Horiguchi *et al.*, 2000, 2002). La gónada envuelve el hepatopáncreas y ambos órganos forman el llamado apéndice conical (Booolootian *et al.*, 1962; Mottet, 1978; FAO, 1995). El color del apéndice conical indica el sexo del animal, presentándose generalmente beige en machos y grisáceo oscuro en hembras, y aumenta en tamaño a medida que los animales alcanzan la máxima madurez (Hayashi, 1980a).

El control endocrino de la gametogénesis se activa en las células neurosecretoras, que se encuentran en el ganglio cerebral (Hanh, 1992). Una vez activada, en el interior de la gónada femenina, los oocitos se desarrollan unidos a la trabícula (la cual divide la gónada en compartimentos), primero en una fase pre-vitelogénica y posteriormente en una fase vitelogénica, y cuando alcanzan su máxima madurez, se desprenden y se depositan en el lumen de la gónada adquiriendo formas irregulares (Martin *et al.*, 1983; Sobhon *et al.*, 1999;

Apisawetakan *et al.*, 2001; Fukazawa *et al.*, 2007) (Figura 7). El tamaño de un oocito maduro varía entre las diferentes especies de oreja de mar, y mide entre 150 y 200  $\mu\text{m}$  (Martin *et al.*, 1983; Capinpin *et al.*, 1998; Apisawetakan *et al.*, 2001). En el caso de los machos, las espermatogonias se desarrollan adheridas a la trabícula, y a medida que se desarrollan y alcanzan el estado de espermatidas adquieren forma ovalada y se desprenden de la trabícula, más tarde, se forman el acrosoma (la cabeza) y la cola del espermatozoide. La longitud de los espermatozoides es aproximadamente de 6  $\mu\text{m}$  (Martin *et al.*, 1983).



**Figura 7** Morfología del ovario de la oreja de mar: Tr trabícula, GE células germinales, OM oocitos maduros, OD oocitos en desarrollo, PO pared exterior del ovario, GD glándula digestiva (modificado de Martin *et al.*, 1983).

Los principales factores externos que influyen en la gametogénesis son la nutrición y las fluctuaciones de la temperatura (Kikuchi y Uki, 1974b; Webber y Giese, 1969; Hayashi, 1980a; Uki y Kikuchi, 1984; Hahn, 1989, 1994). De hecho, el ciclo reproductivo es diferente para las distintas especies de oreja de mar, y varía en función de las condiciones medioambientales donde viven (Young y DeMartini, 1970; Shepherd y Laws, 1974; Takashima *et al.*, 1978; Hayashi, 1980a; Tutschulte y Connell, 1981; Hahn, 1989; Bussarawit *et al.*, 1990; Capinpin *et al.*, 1998; Sobhon *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2003). A grandes rasgos, de acuerdo con su periodo de puesta, las especies de oreja de mar se pueden clasificar en tres grupos: las especies que desovan durante el verano, las que desovan durante otro periodo que no sea el verano y las que

desovan durante todo el año (Booolootian *et al.*, 1962; Shepherd y Laws, 1974). Si bien, los gametos se desarrollan al unísono en los ovarios de la oreja de mar (Young y DeMartini, 1970; Takashima *et al.*, 1978; Jebreen *et al.*, 2000; Grubert y Ritar, 2004; Fukazawa *et al.*, 2007), las especies de aguas templadas como *Haliotis discus hannai*, tienen la capacidad de desarrollar dos cohortes de oocitos maduros, con un acondicionamiento de reproductores a una temperatura constante de 20 °C (Fukazawa *et al.*, 2007), mientras que las especies de aguas tropicales como *Haliotis asinina*, son capaces de producir tres cohortes de oocitos maduros en su periodo de puesta que se extiende a lo largo de todo el año excepto en abril y mayo (Jebreen *et al.*, 2000).

La inducción a la puesta es activada por las células neurosecretoras situadas en los ganglios pleuropedal y visceral (Hahn, 1992), y en células granulosas situadas en la trabícula (Chanpoo *et al.*, 2001). Estas células secretan hormonas tipo prostaglandinas (identificada en la oreja de mar como aELH, egg-laying hormone), y cuando son liberadas, se unen a las células musculares de la trabícula, causando la contracción de la misma y la expulsión de los gametos de las gónadas (Chanpoo *et al.*, 2001).

Entre los factores externos que inducen la puesta en la naturaleza se encuentran: un cambio brusco en la temperatura del agua, la exposición de los reproductores al aire durante la bajamar, cualquier otro estímulo que pueda causar la contracción del músculo del pie (Hooker y Morse, 1985), y las mareas vivas en el cambio de fase lunar (Jebreen *et al.*, 2000). La oreja de mar desova durante el atardecer o anochecer. Los individuos salen de sus refugios, y se sitúan en las cimas de las rocas donde se asegure el contacto de los gametos femeninos y masculinos (Hanh, 1989). Los gametos maduros contenidos en la gónada, son expulsados al agua circundante a través del segundo orificio de la concha, con la ayuda de una contracción del músculo del pie (Hayashi, 1980a). Los óvulos son circulares y presentan una densidad mayor que la del agua de mar, como consecuencia, se van hundiendo hacia el fondo, mientras que los espermatozoides muestran una gran motilidad y alcanzan los óvulos para fertilizarlos (Peña, 1986; Clavier, 1992b).

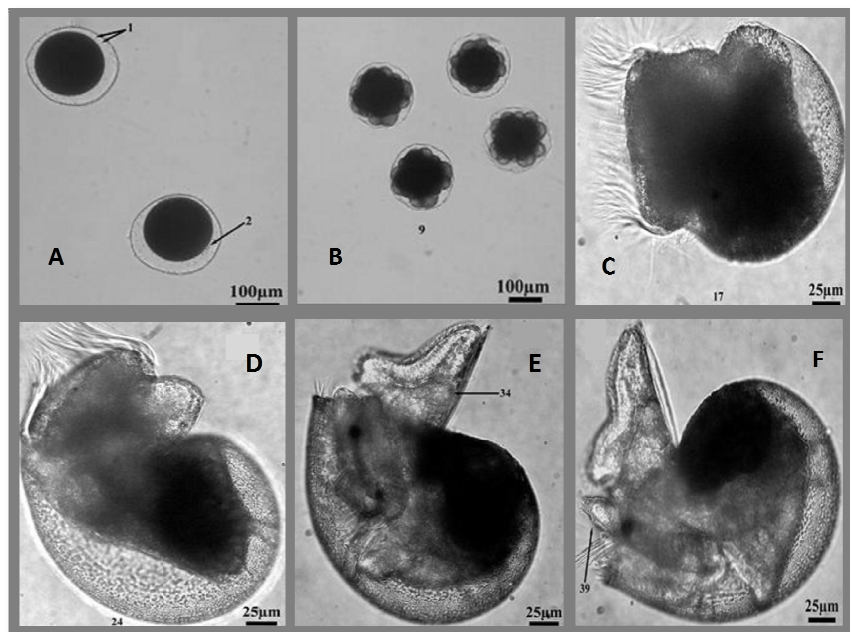
La fertilización se produce cuando el espermatozoide libera una lisina que solubiliza la capa vitelina del óvulo (Lewis, 1992), y está influenciada por la temperatura del agua (cualquier variación altera la esperanza de vida de los espermatozoides), el estado de madurez del animal (solamente los espermatozoides y los oocitos totalmente maduros tienen un potencial de fertilización alto) (FAO, 1995) y la densidad de reproductores (Zhang, 2008). Clavier (1992b) observa, en *Haliotis tuberculata*, tasas de fertilización nulas en densidades inferiores a  $10^3$  espermatozoides/ml, caso que se puede dar en la naturaleza cuando la densidad de

reproductores es baja en una población, y como consecuencia los ejemplares se encuentran distanciados unos de otros resultando en una dilución de espermatozoides antes de entrar en contacto con el huevo.

### 1.6.3. Fases de desarrollo

#### Desarrollo embrionario y larvario

El desarrollo embrionario y larvario en *Haliotis tuberculata coccinea*, ha sido descrito a 23°C en condiciones de cultivo por Courtois de Vicoise *et al.* (2007) (Figura 8).



**Figura 8** Desarrollo embrionario y larvario de *Haliotis tuberculata coccinea*. A: huevos fecundados, B: estado de Mórula, C: larva Trocófora, D: torsión de 180° de la masa céfalo-pedal, E: larva Veliger, F: larva lista para fijarse (modificado de Courtois de Vicoise *et al.*, 2007).

El desarrollo embrionario comprende ocho estados celulares, en los cuales, el huevo se divide sucesivamente hasta alcanzar el estado de mórula a las 2.30 horas después de la fertilización. Más tarde, a las 4.30 horas, aparece el estado de gástrula. La eclosión y como consecuencia, el comienzo de la fase larvaria de *Haliotis tuberculata coccinea*, se produce a las 9 horas cuando el embrión alcanza el estado de Trocófora dentro de la membrana. En el estado de Trocófora libre, las larvas nadan libremente y se agregan describiendo movimientos en forma de espiral en la columna de agua. La formación de la concha comienza a las 9.30 horas y

es entonces cuando las larvas pasan al estado Veliger. A las 15.30 horas aparece el músculo retractor y una masa pedal. Más tarde comienzan a desarrollarse los ojos (17 horas), y la concha larval (18.30 horas). Se produce entonces una torsión primero de 90° y después se completa hasta los 180° (21.30 horas). El opérculo aparece a las 25 horas y más tarde aparece el propidium con sus cilios (39 horas). Los tentáculos cefálicos y epipodales se desarrollan a las 52.30 horas. A las 58 horas, aparecen dos túbulos en los tentáculos cefálicos y es a las 61.30 horas, cuando aparece el tercer túbulo. En este momento las larvas, en estado Veliger tardío, buscan un sustrato donde fijarse.

### **Fijación y metamorfosis**

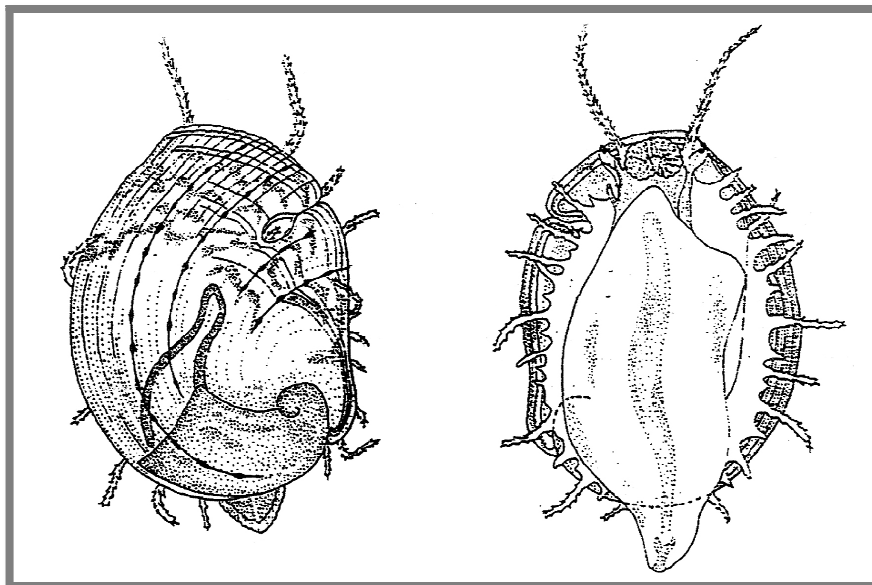
La fijación se define como el contacto de las larvas con un sustrato, y conduce a la metamorfosis donde la larva, de hábito pelágico, adquiere un hábito bentónico (McShane, 1992) y comienza a alimentarse del sustrato exterior (Kawamura *et al.*, 1998). Es un periodo crítico del desarrollo, en el que se producen elevadas mortalidades. Las larvas de la oreja de mar requieren señales específicas para fijarse a un sustrato, como son: señales químicas (feromonas y sustancias bioquímicas presentes en la superficie de las algas), físicas (topografía adecuada del sustrato) y biológicas (ausencia de predadores) (Morse y Morse, 1984; McShane, 1992; Roberts, 2001). Muestran preferencia por algas rojas incrustantes, comunes en los ambientes costeros (Morse y Morse, 1984).

Una vez se fija la larva, comienza el desarrollo post-larvario y la metamorfosis. El desarrollo post-larvario y la metamorfosis fue descrita por Koike (1978), en *Haliotis tuberculata*, y comienza cuando la larva pierde los cilios que le permitían nadar en la columna de agua. A partir del sexto día el rostro de la post-larva está bien formado, y la planta del pie está más desarrollada permitiendo a la post-larva arrastrarse más activamente, también el movimiento del corazón es aparente. Al noveno día se observa el movimiento de la rádula. A la edad de 16 días, la concha se hace aplanada e incrementa en grosor, también aumenta la longitud de tentáculos cefálicos y el número de papilas en ellos. A los 25 días se puede observar a través de la concha, la línea oscura del intestino, y la conducta de alimentación es muy activa concluyendo el periodo de metamorfosis (Figura 9).

#### **1.6.4. Alimentación y crecimiento**

Al finalizar la metamorfosis, la post-larva es capaz de ramonear la superficie de las algas en donde se fijó, ingiriendo las células que mudan, y el mucus, rico en carbohidratos secretado por el epitelio de las algas (Hooker y Morse, 1985). A medida que la oreja de mar crece, las diatomeas epífitas de las algas, otras algas microscópicas y bacterias epibióticas se vuelven

asimismo fuentes importantes de alimento (Hooker y Morse, 1985; FAO, 1995; Kawamura *et al.*, 1998).



**Figura 9** Post-larva de *Haliotis tuberculata* a la edad de 25 días. Izquierda: vista superior con el detalle del intestino a través de la concha. Derecha: vista inferior donde se observa el músculo del pie y el epipodium (modificado de Koike, 1978).

Entre uno y tres meses, dependiendo de la temperatura del agua y de la especie, se forma el primer poro respiratorio en la concha y comienza el estado juvenil (Hooker y Morse, 1985). A los tres meses de edad, *Haliotis tuberculata* posee aproximadamente 20 tentáculos epipodales, se observa el brillo nacarado del interior de la concha, y su longitud es aproximadamente de 3,3 mm (Koike, 1978). En aproximadamente 6 meses, los juveniles poseen una rádula lo suficientemente robusta para alimentarse de macroalgas (Hooker y Morse, 1985). A partir de este momento, las preferencias alimenticias de las distintas especies de oreja de mar, varían en función del hábitat y la disponibilidad de macroalgas (Barkai y Griffiths, 1986; Dunstan *et al.*, 1996), y consumen cerca de un 35 % de su peso al día (Tahil y Juinio-Menez, 1999). La alimentación de las orejas de mar es fundamentalmente nocturna (Crofts, 1929; Mottet, 1978). Como son animales que tienden a realizar pocos desplazamientos, su alimentación se basa principalmente en las macroalgas que la corriente va acumulando y poniendo a su disposición, quedando en segundo lugar las que poseen en su entorno más inmediato (Hayashi, 1980b; Hooker y Morse, 1985; Clavier y Chardy, 1989). Para capturar las algas que arrastra la corriente, las orejas de mar adoptan una postura característica elevando la concha, extendiendo los tentáculos y levantando la cara anterior del pie, con el que sujetará su captura, entonces el alimento es introducido bajo la concha con el pie, donde puede ser rápidamente ingerido o

bien acumulado para su posterior consumo (Mottet, 1978; FAO, 1995). Aunque no se conoce el alimento natural de *Haliotis tuberculata coccinea*, cabe esperar que parte de su alimentación se base en varias especies de macroalgas rojas y pardas, como son *Liagora* sp., *Lobophora variegata*, *Sargassum* sp. y *Dictyota* sp., puesto que sus poblaciones naturales están asociadas a estas algas (Espino y Herrera, 2002).

Los estudios de crecimiento en poblaciones naturales son escasos (Foster, 1967; Hayashi, 1980b; Clavier y Richard, 1986) y muestran que las poblaciones de *Haliotis tuberculata* hasta los 50 mm en longitud de concha, poseen una tasa de crecimiento entorno a los 15 – 20 mm año<sup>-1</sup>, y que a partir de los 100 mm, el crecimiento se hace prácticamente imperceptible.

### **1.6.5. Mortalidad**

En consonancia con su longevidad y lento crecimiento, la tasa de mortalidad de la oreja de mar es baja en las poblaciones naturales (FAO, 1995). En el caso de una población francesa sana de *Haliotis tuberculata* se estimó en torno a 0,2 año<sup>-1</sup> (Berthou *et al.*, 1985). La mortalidad en la naturaleza es debida principalmente a la depredación de post-larvas (Shepherd y Turner, 1985; Onitsuka *et al.*, 2008), por pequeños gusanos y crustáceos crípticos que comparten los sustratos de fijación (Morse *et al.*, 1979), de ejemplares juveniles y adultos por pulpos y estrellas de mar (Hooker y Morse, 1985). También pueden ser depredados por algunas especies de cangrejos, peces y langostas (Cox, 1962; Shepherd, 1973). Otras causas de mortalidad en post-larvas son debidas a factores físicos o medioambientales, tales como las corrientes marinas y los movimientos de arena (Schiel, 1993; Naylor y McShane, 2001; Onitsuka *et al.*, 2008), y el efecto de las tormentas en juveniles y adultos (Mottet, 1978). Así mismo, las actividades humanas y las enfermedades son factores que producen elevadas mortalidades.

### **1.6.6. Patologías**

Entre las patologías más comunes en el género *Haliotis* se encuentran: el parasitismo, las enfermedades víricas y las enfermedades bacterianas.

#### **Parasitismo**

La concha externa de la oreja de mar es susceptible de ser infestada por numerosos organismos invertebrados sésiles (Blake y Evans, 1973; Lauckner, 1983; Lleonart *et al.*, 2003b; Bower, 2003). Entre ellos se encuentran: la esponja *Cliona* sp. y poliquetos perforadores de la familia *Spionidae* (Clavier, 1992a). Las especies de poliquetos perforadores, más dañinos para la oreja de mar, pertenecen a los géneros *Polydora* y *Boccardia* (Lleonart *et al.*, 2003b; Simon *et al.*,

2006), y también una especie de poliqueto sabélido, *Terebrasabella heterouncinata* (Leighton, 1998; Simon *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2007). Estos poliquetos perforadores se han encontrado tanto en poblaciones naturales de orejas de mar, como en ejemplares cultivados (Sphepherd, 1973; Clavier, 1992a; Ruck y Cook, 1998; Lleonart *et al.*, 2003b), y afectan a la oreja de mar reduciendo significativamente la condición de la carne (Simon *et al.*, 2006; Sato-Okoshi *et al.*, 2008), causando incluso la muerte en infestaciones avanzadas (Lleonart *et al.*, 2003a). Si bien, en ejemplares cultivados, han sido numerosos los intentos para erradicar este tipo de infestación, actualmente no existe ningún tratamiento efectivo que no cause daños a la oreja de mar, y que demuestre una eficacia total contra los gusanos (Shields *et al.*, 1998; Kuris y Culver, 1999; Lleonart *et al.*, 2003a; Leighton, 1998; Moore *et al.*, 2007).

Otro tipo de parasitismo, que pueden afectar a la oreja de mar, es la infestación de las gónadas por trematodos (Crofts, 1929; Bower, 2003), y también protozoos parásitos del género *Haplosporidian*, éstos últimos causantes de grandes mortalidades en la especie *Haliotis iris* presente en Nueva Zelanda (Diggles *et al.*, 2002).

### **Enfermedades víricas**

La amiotrofia es una patología producida por un virus, que ocasiona importantes pérdidas económicas a los cultivadores de semillas de *Haliotis discus* en Japón (Nakatsugwa *et al.*, 1999). También se ha observado elevadas mortalidades por infecciones víricas en *Haliotis diversicolor* (Wang *et al.*, 2000, 2004)

### **Enfermedades bacterianas**

A finales de la década de los 90, se produjo una mortalidad masiva en las poblaciones naturales de la oreja de mar francesas, que acabó con el 60 – 80 % de la población afectada (Nicolas *et al.*, 2002). Esta mortalidad fue causada por *Vibrio carchariae*, responsable también de importantes pérdidas en cultivos de *Haliotis diversicolor supertexta* (Nicolas *et al.*, 2002). Otras enfermedades bacterianas son las causadas por *Vibrio fluvialis* en *Haliotis discus hannai*, conocida como la enfermedad pustular (pustular disease) (Li *et al.*, 1998), *Vibrio parahaemolyticus* en *Haliotis diversicolor supertexta* en Taiwan (Liu *et al.*, 2000), *Vibrio harveyi* y *Vibrio splendidus* en *Haliotis rubra* y *Haliotis laevigata* en Tasmania (Bower, 2003). Entre los tratamientos utilizados contra las infecciones bacterianas, Dixon *et al.* (1991) encuentran efectiva la exposición a agua ozonizada, y un tratamiento con un antibiótico de amplio espectro.

El caso más conocido e investigado de mortalidades masivas, originadas por bacterias en especies de orejas de mar, es la enfermedad del síndrome de deterioro (withering



syndrome). Se detectó por primera vez en California a mediados de los ochenta y a finales de esa década, las poblaciones de *Haliotis cacherodii*, *Haliotis rufescens* y *Haliotis corrugata* disminuyeron entre un 51 y 98 % en las Islas del Canal de California (Haaker *et al.*, 1992). La bacteria causante de esta enfermedad fue *Candidatus xenohaliotis californiensis* (Friedman *et al.*, 2000), y existe una relación entre las elevadas temperaturas y el incremento de mortalidad, de hecho, esta enfermedad se asocia al fenómeno El Niño (Steinbeck *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 1997). El contagio tiene lugar mediante el agua, sin necesidad de contacto físico entre individuos (Moore *et al.*, 2000), y parece que el tratamiento a base de oxitetraciclina permite disminuir las pérdidas en granjas de cultivo (Friedman *et al.*, 2003).

## 1.7. EL CULTIVO DE LA OREJA DE MAR

El cultivo de la oreja de mar comenzó hace más de 80 años en Japón (Elbert y Houk, 1984), y se practica actualmente con éxito en varios lugares del mundo, siendo de gran importancia para la economía de muchos países (Cook y Gordon, 2010).

Si bien, la tecnología de cultivo de algunas especies de oreja de mar está totalmente desarrollada (FAO, 1990), a la hora de cultivar nuevas especies, como es el caso de *Haliotis tuberculata coccinea*, hay que adaptar la tecnología existente a las condiciones específicas de la especie, y al lugar en donde se desarrolla el cultivo. El cultivo de oreja de mar se puede dividir en tres fases: el acondicionamiento de reproductores, la obtención de semilla y el engorde hasta la talla comercial. Las dos primeras fases se realizan en el criadero, mientras que la última en la granja de engorde.

El criadero suele ser una instalación cubierta situada en tierra firme, y requiere del control de las condiciones de cultivo: temperatura, filtración y de la esterilización de grandes volúmenes de agua. El producto final de un criadero es la semilla de oreja de mar. Se denomina semilla a los ejemplares de una talla aproximada de 10 mm en longitud de concha, que son capaces de alimentarse de macroalgas frescas. Normalmente el acondicionamiento de reproductores se realiza en una sala destinada a este fin, donde se mantienen los reproductores y se realizan las puestas inducidas y la fertilización. La eclosión de los huevos y el cultivo larvario (fase pelágica), se realiza normalmente en otra sala en tanques diseñados para este fin. Cuando se acerca el momento de la fijación y de la metamorfosis, las larvas son transferidas a otros tanques provistos de placas de plástico para aumentar la superficie de fijación, cubiertas de films de diatomeas como sustratos de fijación y alimentación para el crecimiento de las post-larvas (Takami *et al.*, 1997). Esta es una fase crítica del cultivo, donde la mortalidad post-larvaria

puede alcanzar un 90%, en los dos siguientes meses a la fijación (Roberts *et al.*, 1999), y requiere del cultivo de diatomeas en condiciones controladas para abastecer de alimento a las post-larvas. Recientemente se han desarrollado otros métodos para la fijación, como la utilización de la macroalga verde *Ulvella lens* en las placas de fijación (Takahashi y Koganezawa, 1988; Seki, 1997; Daume *et al.*, 2000), y la utilización de sprays compuestos principalmente de agar-agar y microalgas secas (Stott *et al.*, 2004), con el fin de optimizar y minimizar las tareas en esta fase de cultivo. En un estudio realizado por Courtois de Vicose *et al.* (2010), se prueban diferentes especies de diatomeas frente a *Ulvella lens* y a un alga roja incrustante para inducir la fijación y el crecimiento de post-larvas de *Haliotis tuberculata coccinea*, y muestra que si bien, las mayores tasas de fijación se obtuvieron en placas de plástico envejecidas con algas coralinas incrustantes, a la hora de una producción masiva de semilla es más viable la utilización de la macroalga bentónica *Ulvella lens*. Así mismo, Courtois de Vicose (2011) estudia el potencial de las esporas de la macroalga *Ulva rígida* para inducir la fijación, y como alimento de post-larvas de *Haliotis tuberculata coccinea* y obtiene resultados satisfactorios.

La fase de engorde comprende el cultivo de las semillas hasta alcanzar la talla comercial. Esta etapa del cultivo permite una mayor diversidad de las instalaciones, pudiendo realizarse en tierra firme (en tanques), o en diferentes tipos de estructuras en el medio marino (jaulas, barriles, nasas, etc.) (González y Malo de Molina, 2002; Wu *et al.*, 2009). Recientemente, se ha prestado atención al cultivo en sistemas integrados por oreja de mar-macroalgas-oreja de mar (Robertson-Andersson *et al.*, 2008; Bolton *et al.*, 2009) y peces-macroalgas-oreja de mar (Neori *et al.*, 2000, 2007). El cultivo de macroalgas en sistemas integrados es interesante porque se produce alimento para el engorde de oreja de mar, y se eliminan parte de los desechos (nitratos y fosfatos) asociados al cultivo de oreja de mar y de peces y además es relevante, sobre todo en el caso de Canarias, porque no existe una producción de macroalgas a nivel comercial. Estudios recientes realizados por Viera *et al.* (2005, 2011) muestran que las macroalgas (*Ulva rígida*, *Gracilaria cornea*, *Hypnea spinella* e *Hypnea musciformis*), producidas en un sistema de biofiltración, son ricas en proteínas, y que su composición nutricional satisface los requerimientos de proteínas, lípidos e hidratos de carbono de la oreja de mar, resultando en un crecimiento satisfactorio y supervivencia de *Haliotis tuberculata coccinea*.

## **1.8. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES**

Se denomina acondicionamiento de reproductores al mantenimiento de individuos adultos bajo condiciones favorables, que garanticen una maduración correcta de las gónadas, y puestas exitosas en el momento y condiciones deseadas.

Antes de que los ejemplares adultos sean capaces de reproducirse, es necesaria la maduración de sus órganos sexuales. Las especies de oreja de mar (ej. *Haliotis tuberculata*, *Haliotis iris*, *Haliotis discus hannai*, *Haliotis midae* y *Haliotis laevigata*), pertenecientes a zonas de agua templada (Francia, Nueva Zelanda, Japón, Sudáfrica, Australia etc.), normalmente presentan una fase de reposo sexual durante el invierno, y el desarrollo de la gónada coincide con un cambio estacional de temperatura (un incremento o descenso), asociado a un incremento en la disponibilidad de alimento en la naturaleza (Shepherd y Laws, 1974; Hayashi, 1980a; Ault, 1985; Lleonart, 1992; Uki, 1989; Campbell *et al.*, 2003). En cambio, las especies de orejas de mar (ej. *Haliotis varia* y *Haliotis asinina*) de zonas tropicales (Tailandia, Filipinas, etc.), muestran un ciclo reproductivo continuo a lo largo del año (Bussarawit *et al.*, 1990; Sobhon *et al.*, 1999; Jebreen *et al.*, 2000).

El Experimento I del presente trabajo, estudia la biología reproductiva de una población natural de *Haliotis tuberculata coccinea*, lo que permitirá determinar el ciclo reproductivo y los factores que lo controlan, la talla adecuada para el acondicionamiento de reproductores y la mejor época para la inducción a la puesta. Estos conocimientos contribuirán a una mejor planificación en las tareas de un criadero (inducción al desove, cultivo larvario y preparación de los tanques del cultivo post-larvario).

### **1.8.1. Obtención de reproductores**

Para llevar a cabo una producción de oreja de mar, en primer lugar es necesario formar un stock de reproductores. Los reproductores pueden capturarse del medio natural, o pueden obtenerse en las granjas de cultivo escogiendo los individuos que han alcanzado la madurez sexual (Hooker y Morse, 1985; FAO, 1990). La selección de un stock de hembras reproductoras, que tengan una alta fecundidad y produzcan huevos de calidad en las puestas, es importante para el éxito del cultivo, puesto que reduce la necesidad de mantener un grupo numeroso de hembras, y como consecuencia, minimiza la cantidad de alimento necesario y las labores para mantener el stock de reproductores (Daume, 2007).

En el cultivo de la oreja de mar, ha sido práctica habitual capturar los reproductores en la naturaleza, en el momento que presentan su máximo grado de maduración sexual (Fleming, 2001). Este es el caso de Nueva Zelanda, Estados Unidos y Sudáfrica con las especies *Haliotis iris*, *Haliotis rufescens* y *Haliotis midae* respectivamente, y permite por un lado tener un periodo corto de acondicionamiento, y por otro una mejor respuesta a la inducción al desove puesto que se utilizan individuos muy maduros (Tong *et al.*, 1992; Ault, 1985; Fleming, 2001; Najmudeen y Victor, 2004). Sin embargo, recientemente hay una mayor tendencia, por parte de

investigadores y productores comerciales, a realizar el acondicionamiento de reproductores, en condiciones de cultivo controladas durante todo el año (Daume y Ryan, 2004; Grubert y Ritar, 2005; Freeman *et al.*, 2006). Este sistema permite elegir la época de la maduración de las gónadas controlando los parámetros de cultivo (ej. temperatura), de esta forma, se puede elegir la época del año para la inducción a la puesta, y como resultado se rentabiliza mejor las instalaciones (Lleonart, 1992). Así mismo, permite la aplicación de programas de mejora genética (Daume, 2007).

A día de hoy en Canarias *Haliotis tuberculata coccinea* está protegida legalmente (BOC-2001/097), y su captura no se puede realizar de forma habitual en el medio natural. En este sentido, lo más viable es mantener un stock de reproductores permanente en las instalaciones de cultivo.

### **1.8.2. Condiciones de cultivo**

Durante el acondicionamiento es necesario que los reproductores se encuentren en óptimas condiciones, para que inviertan su energía en la producción y maduración de los gametos, y no en mitigar los efectos del estrés (Hooker y Morse, 1985; Fleming, 2001). En este sentido la temperatura, la alimentación, la iluminación, la calidad del agua y los cuidados de los animales son factores que hay que tener en consideración.

#### **Temperatura**

Cuando la alimentación es la adecuada, la temperatura es el principal factor exógeno que afecta la maduración de la gónada (Webber y Giese, 1969; Hahn, 1989). Kikuchi y Uki (1974b), fueron los primeros investigadores que demostraron la relación entre la temperatura y la maduración sexual en la oreja de mar, y desarrollaron el llamado EAT (Effective Accumulative Temperature), expresado como EAT (°C/día). Este índice establece el momento adecuado para inducir la puesta, en base a la temperatura empleada en el acondicionamiento y la temperatura cero biológica (donde no se observa la maduración sexual) específica para cada especie de oreja de mar. De esta forma, dependiendo de la temperatura utilizada durante el acondicionamiento, se puede acortar el periodo para alcanzar la madurez de las gónadas. La manipulación de la temperatura permite la obtención de puestas en cualquier momento del año (Grubert y Ritar, 2005). Este método se ha aplicado en varias especies de oreja de mar, y parece que es totalmente efectivo en las especies pertenecientes a aguas templadas con un periodo de puesta en verano (Uki y Kikuchi, 1984; Hanh, 1989; Fleming, 2001; Grubert y Ritar, 2004). Sin embargo, en las especies de regiones tropicales, como *Haliotis asinina*, además de la temperatura, la ovulación y el desove aparecen fuertemente asociadas al régimen de mareas

vivas (Jebreen *et al.*, 2000), incluso en condiciones de cultivo (Counihan *et al.*, 2001), lo que permite, si se cuenta con un número considerable de reproductores, la posibilidad de obtener puestas durante todo el año, sin la necesidad de controlar la temperatura durante el acondicionamiento.

## **Alimentación**

Una alimentación adecuada es esencial para un desarrollo óptimo de la gónada. De hecho, se ha observado que la disponibilidad de alimento es una de las causas de la variación del ciclo reproductivo de poblaciones diferentes, incluso cercanas, de una misma especie de oreja de mar (Hayashi, 1980a; Hanh, 1989).

La bibliografía existente sobre los requerimientos nutritivos durante el acondicionamiento es escasa. Estudios recientes muestran, en *Haliotis laevigata*, la importancia de la nutrición en la composición y tamaño de los huevos, y en la frecuencia de puestas (Daume y Ryan, 2004; Freeman *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2006). Es sabido que ciertos ácidos grasos específicos, incorporados en la dieta, juegan un papel importante en la maduración de la gónada de la oreja de mar (Uki y Watanabe, 1992; Bautista-Teruel *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002), y que 3 meses de alimentación son suficientes para modificar la composición bioquímica de los huevos (Daume y Ryan, 2004). Entre los ácidos grasos, cabe destacar el ácido Araquinódico (20:4n-6), principal precursor de las hormonas tipo Prostaglandinas que influyen en la reproducción de moluscos (Osada *et al.*, 1989). Así mismo, otros estudios muestran que la cantidad de proteína y de lípidos incorporados en la dieta, afectan al desarrollo de la gónada y a la fecundidad (Jackson *et al.*, 2001; Bautista-Teruel *et al.*, 2001).

Si bien se han diseñado dietas artificiales específicas para el acondicionamiento de reproductores (Daume y Ryan, 2004; Daume, 2007), se recomienda la utilización de macroalgas frescas dada la poca estabilidad del pienso en el agua (Daume, 2007). De hecho, la práctica más común es ofrecer a los reproductores una dieta basada en una mezcla de algas frescas durante la fase de acondicionamiento (Fleming, 2001). Esta mezcla varía en función de las preferencias alimenticias de la especie y la disponibilidad de algas locales, de esta forma, especies como: *Haliotis discus hannai* son acondicionadas con *Undaria spp.* y *Laminaria spp.*, *Haliotis rufescens* con *Nerocystis spp.* (Fleming, 2001) y *Haliotis tuberculata* con algas del tipo *Palmaria spp.* (FAO, 1995).

En Canarias, debido a que la cantidad disponible de algas, de arribazón, no es abundante, y no se cultivan de manera industrial, se hace necesario buscar un método alternativo a la obtención de algas del medio natural. Una alternativa es el cultivo de

macroalgas tanto en tanques como en estructuras marinas (Neori *et al.*, 2000; Viera *et al.*, 2005, 2011; Hwang *et al.*, 2009). Además, el cultivo de algas, bajo condiciones controladas, da la posibilidad de alterar la calidad nutritiva de las mismas (Neori *et al.*, 2000). En el Experimento II del presente trabajo, se realiza el cultivo en tanques del alga *Gracilaria cornea*, y tiene como objetivo principal determinar el efecto del porcentaje de proteína, en la dieta de los reproductores, sobre la reproducción de *Haliotis tuberculata coccinea*. Este experimento nos proporcionará información sobre la viabilidad de producir alimento adecuado para la fase de acondicionamiento, y ampliará el conocimiento sobre los requerimientos nutricionales de los reproductores.

### **Iluminación**

Un estudio realizado por Setyono (2004), muestra en *Haliotis asinina* que el fotoperiodo, durante el periodo de acondicionamiento no influye en la maduración de la gónada, y se observa una correcta maduración tanto en un régimen de 24 horas de luz como, en uno 24 horas de oscuridad. En cambio, se ha observado que en puestas inducidas, el tiempo requerido para que los reproductores desoven, es menor si la inducción se produce una hora antes del inicio del periodo de la fase oscura utilizado durante el acondicionamiento (Uki y Kickuchi, 1982), es decir, al atardecer si se mantienen los reproductores bajo condiciones naturales de fotoperiodo, o antes de las horas de oscuridad, si se mantienen los reproductores bajo un régimen de fotoperiodo artificial. La práctica más extendida es el acondicionamiento en un régimen de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Hanh, 1989; Fleming, 2001; Grubert y Ritar, 2002, 2004, 2005; Daume, 2007). Así mismo, es posible alterar el fotoperiodo natural con el propósito de obtener puestas durante la mañana (Grubert y Ritar, 2005).

Teniendo en cuenta que la oreja de mar es un animal foto-fóbico (Hanh, 1989), se aconseja durante el periodo de acondicionamiento mantener una intensidad de luz baja, entre 50 y 150 Lux, medida en el fondo del tanque (Fleming, 2001; Grubert y Ritar, 2004, 2005; Daume, 2007). Así mismo, se aconsejable incorporar refugios en los tanques de acondicionamiento, imitando las rocas y recovecos de la naturaleza donde la oreja de mar vive durante las horas de luz.

### **Calidad del agua**

Un acondicionamiento adecuado requiere el mantenimiento de una buena calidad del agua, con el objetivo de mitigar el estrés de los reproductores. Los factores que determinan la calidad del agua son: un diseño adecuado de los tanques, una alta tasa de renovación del agua, una apropiada densidad de cultivo, una apropiada estrategia de alimentación y la eliminación regular de desechos (Hanh, 1989; Fleming, 2001; Grubter y Ritar, 2002).

El diseño de los tanques de acondicionamiento debe permitir la eliminación de los desechos de cultivo (heces, mucus y restos de comida), perturbando los reproductores lo mínimo posible. Por ejemplo, en Japón es habitual el uso de tanques provistos de una cortina de aire a lo largo del fondo, que suspende continuamente los desechos del cultivo en la columna de agua, permitiendo su eliminación con la salida de agua del tanque (Fleming, 2001). Así mismo, se pueden incorporar cestas suspendidas en los tanques con el objetivo de separar los animales de las heces y restos de comida. Sin embargo, para una correcta higiene, es necesaria la limpieza manual periódica de los tanques sifonando el fondo del tanque y/o vaciándolo completamente (Fleming, 2001; Grubert y Ritar, 2002). Es importante entonces, que el diseño del sistema permita un llenado rápido del tanque después de la limpieza, para perturbar los reproductores lo mínimo posible. La regularidad de la limpieza manual depende principalmente de la estrategia de alimentación; la utilización de pienso produce más desechos que la utilización de macroalgas y como consecuencia requiere una limpieza más regular. En ambos casos, los niveles de nitritos y amonio no deben superar 1,12 mg NO<sub>2</sub>-N / l y 0,042 mg NH<sub>3</sub>-N / l, respectivamente (Harris *et al.*, 1997).

La densidad de cultivo se mantiene más baja que en la fase de engorde. Por ejemplo, en *Haliotis tuberculata* se aconseja una densidad de cultivo de 10 g/l (González y Malo de Molina, 2002). Con *Haliotis laevigata* y *Haliotis rubra* se mantienen entre 15 y 20 reproductores de 100 a 120 mm en longitud de concha en tanques de 150 litros (Grubert y Ritar, 2002). La densidad de cultivo debe ser la apropiada para mantener una la saturación de oxígeno disuelto por encima de un 80 % (Uki y Kikuchi, 1981; Grubter y Ritar, 2002).

### **Cuidado de los animales**

Es importante que los ejemplares que van a producir la nueva generación de orejas de mar se encuentren sanos. En este sentido, se debe evitar cualquier herida en los animales y la proliferación de enfermedades y/o infestaciones de parásitos.

Las orejas de mar se fijan fuertemente a los refugios, y en las tareas que precisen su desprendimiento (ej. muestreos para elegir los reproductores, para controlar el crecimiento, el estado de salud, etc.), la manipulación mecánica (ej. uso de paletas o espátulas) puede causar heridas en el músculo del pie. Estas heridas pueden ser mortales, puesto que la oreja de mar posee una baja capacidad de cicatrización y ausencia de un mecanismo de coagulación de la sangre (Armstrong *et al.*, 1971; Genade *et al.*, 1988). En este sentido, el uso de anestésicos es una alternativa segura (White *et al.*, 1996). Entre ellos: el sulfato de magnesio, el 2-phenoxyethanol, el pentobarbitúrico y la benzocaina (Sagara y Ninomiya, 1970; Prince y Ford,

1985; McShane y Smith, 1988; Hanh, 1989; Tong *et al.*, 1992; White *et al.*, 1996; Aquilina y Roberts, 2000; Sharma *et al.*, 2003), siendo todas ellas sustancias químicas no degradables.

Las especies sometidas a cultivo son un medio apropiado para el desarrollo de enfermedades e infestaciones, ya que los animales se encuentran hacinados en un espacio limitado. En Canarias, abundan diferentes especies de poliquetos perforadores, asociados a sustratos que contienen carbonato cálcico (Pascual y Núñez, 1999), y al igual que sucede en otros lugares, donde se desarrolla el cultivo de oreja de mar (Leonart *et al.*, 2003b; Simon *et al.*, 2006), puede darse el caso de infestaciones masivas. Actualmente no existe ningún método eficaz que elimine la infestación por poliquetos y no dañe la oreja de mar (Shields *et al.*, 1998; Kuris y Culver, 1999; Leonart *et al.*, 2003a; Leighton, 1998; Moore *et al.*, 2007).

El Experimento III del presente trabajo tiene la finalidad de probar el aceite de clavo como anestésico natural, en las tareas que requieran el desprendimiento de los individuos de los refugios, y el Experimento IV, tiene como objetivo la identificación de la especie de poliqueto que infestó, en 2008, a la oreja de mar en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas, y probar la eficacia del mebendazol como antihelmíntico en individuos adultos de *Haliotis tuberculata coccinea*.

### **1.8.3. La inducción a la puesta y fertilización**

#### **Verificación del estado de maduración**

Durante el acondicionamiento, es útil emplear un "índice de maduración" que permita conocer la evolución gonadal de los ejemplares, y el momento en que están preparados para inducir la puesta artificialmente. Entre los índices más habituales se encuentra el descrito por Kikuchi y Uki (1974b), que establece la madurez gonadal en 4 estados que se designan visualmente: en el estado 0 no se distingue el sexo del animal y a medida que madura, la gónada aumenta en volumen y aparece más protuberante hasta alcanzar su estado de máxima madurez (estado 3). Sin embargo, no todos los individuos alcanzan el estado 3 de maduración durante el acondicionamiento (Fallu, 1991), por lo que es práctica habitual inducir la puesta a animales en estado 2 avanzado. La ventaja de la utilización de este índice reside en que no es un método invasivo, sin embargo, es subjetivo y no asegura la puesta inducida en todas las especies de oreja de mar (ej. *Haliotis discus hanna*) (Fleming, 2001).

El método más fiable para verificar el estado de maduración es el realizado mediante técnicas histológicas: medida del diámetro de los oocitos y morfología de la gónada (Hanh, 1989). En la clasificación propuesta para *Haliotis asinina* por Capinpin *et al.* (1998), se considera



un ovario maduro cuando la mayoría de oocitos presentan un diámetro mayor de 125  $\mu\text{m}$  y se observan oocitos libres de 150  $\mu\text{m}$ , y se considera un testículo maduro, cuando se observan espermatozoides densamente empaquetados. Sin embargo, las técnicas histológicas implican el sacrificio de animales y puesto que la oreja de mar no posee un sistema de cicatrización eficiente (Armstrong *et al.*, 1971, Genade *et al.*, 1988), no es aconsejable tampoco la realización de una biopsia de la gónada puesto que el animal puede ser irrecuperable.

En el Experimento V del presente trabajo se realiza un control histológico del índice visual propuesto por Kikuchi y Uki (1974b), en la gónada femenina de *Haliotis tuberculata coccinea*. Este estudio permitirá conocer el porcentaje de los diferentes estados de oocitos en los diferentes grados de maduración visual. Esta información permitirá determinar el momento más adecuado para inducir la puesta.

### **Técnicas de inducción a la puesta**

Si bien, las puestas naturales son aprovechables en un criadero de oreja de mar, la inducción a la puesta presenta la ventaja de obtener huevos en un momento predecible que permite al granjero/a preparar los tanques larvarios y post-larvarios, así como obtener puestas durante las horas matinales de trabajo.

En condiciones de cultivo, la liberación de los gametos se induce mediante un estímulo artificial. Hoy en día se conocen numerosas técnicas para inducir el desove en la oreja de mar (Hanh, 1989):

*Método físico:* se basa en la exposición prolongada de los reproductores al aire y/o en someter a los animales a cambios de temperatura (elevando la temperatura del agua bruscamente entre 3-6 °C y bajándola después gradualmente durante 3 horas, hasta alcanzar la temperatura ambiente).

*Método químico:* se basa en un aumento de pH y/o en la dilución de hormonas (Kabir *et al.*, 2001) o gametos de la misma especie, en el agua que contiene los reproductores.

*Exposición a Rayos Ultravioleta* (Kikuchi y Uki, 1974a): consiste en hacer pasar el agua del cultivo que abastece al tanque de puesta, a través de una cámara con una bombilla de UV (con una longitud de onda de 254 nm), de donde sale desionizada. Es uno de los primeros métodos desarrollados y se obtienen buenos resultados para todas las especies de oreja de mar (Fallu, 1991).

*Método del Peróxido de Hidrógeno* (Morse *et al.*, 1977): consiste en añadir peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluido en el agua. Este método puede ser mejorado mediante la adición de TRIS (tris-hidroximetil aminometano) (Fallu, 1991; Peña, 1986).

El fundamento teórico de estos dos últimos métodos, radica en que tanto el peróxido de hidrógeno como la radiación UV, en presencia del agua liberan radicales libres de peróxido de hidrógeno (HOO<sup>·</sup>) y di-radicales de peróxido (<sup>·</sup>OO<sup>·</sup>). Estos radicales activan la síntesis enzimática natural de las Prostaglandinas, hormona precursora de la puesta en la oreja de mar (Hanh, 1992).

La elección de uno u otro método de inducción, o la combinación de varios, se basa en la disponibilidad de la materia prima, el equipamiento de las instalaciones y la experiencia del personal. Peña (1986) optimiza el método de peróxido de hidrógeno para *Haliotis tuberculata coccinea* entre 15,3 y 17,5 °C y observa la mejor respuesta cuando se combina este método con TRIS a unas concentraciones de 4 y 8 milimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 4 ml/l de TRIS.

### **Fertilización**

Si los reproductores están lo suficientemente maduros y el estímulo de inducción a la puesta tiene éxito, se produce la liberación del esperma y de los óvulos. Si bien, algunos granjeros inducen la puesta de machos y hembras en el mismo tanque, es preferible realizarlo de forma separada con el propósito de controlar la fertilización, y evitar las deformaciones larvarias como resultado de la poliespermia (Hooker y Morse, 1985).

Los principales factores que afectan la fertilización son: la temperatura del agua, la concentración del esperma, el tiempo de contacto entre los gametos femeninos y masculinos, la edad de los gametos y el tamaño del huevo (Kikuchi y Uki, 1974a, b; Hanh, 1989; Clavier, 1992b; Encena *et al.*, 1998; Babcock y Keesing, 1999; Litaay y DeSilva, 2001; Huchette *et al.*, 2004; Ritar 2004).

Para una fertilización exitosa, es importante añadir la cantidad adecuada de espermatozoides en el volumen de agua que contiene los huevos. Si la cantidad no es suficiente no se obtienen buenas tasas de fertilización y si la cantidad es excesiva, aumentan las deformidades embrionarias debido a la poliespermia (Kikuchi y Uki, 1974c; Stephano, 1992). La concentración óptima de esperma varía entre las especies de oreja de mar, y se estima que está en un rango de entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml (Kikuchi y Uki, 1974c; Clavier, 1992b; Encena *et al.*, 1998; Babcock y Keesing, 1999; Ritar, 2004). Las diferencias observadas pueden deberse en parte, a la distinta morfología de los espermatozoides de las diferentes especies de oreja de

mar, concretamente a la forma del acrosoma (cabeza) del espermatozoide, que si tiene forma de V, facilita la penetración en la membrana del huevo (Ritar, 2004).

El tiempo de contacto entre los gametos es un factor crítico a muy bajas y altas concentraciones de espermatozoos (Babcock y Keesing, 1999; Ritar, 2004). Se pueden obtener fertilizaciones exitosas (del 80 %), si existe un contacto prolongado (40 minutos) a una concentración baja de espermatozoides ( $10^3$  espermatozoides/ml) (Babcock y Keesing, 1999), o bien un contacto corto (< 15 minutos) a una concentración alta ( $10^7$  espermatozoides/ml) (Elbert y Houk, 1984).

Los huevos son viables en las dos primeras horas de vida, en *Haliotis asinina* y *Haliotis laevigata*, a una temperatura de 29,5 y 18,5 °C respectivamente, y si bien, los huevos de 3 y 4 horas de vida se fertilizan exitosamente, no llegarán al estado de mórula durante el desarrollo embrionario (Encena *et al.*, 1998; Babcock y Keesing, 1999). La relación entre la edad de los gametos, la temperatura y la tasa de fertilización fue estudiada por Kikuchi y Uki (1974c), este estudio muestra que a una determinada temperatura, denominada óptima (entre 13,6 y 17,3 °C para *Haliotis discus hannaï*) el porcentaje de fertilización se mantiene alto (un 80 %) con gametos de cuatro horas de vida, sin embargo, por debajo de esta temperatura óptima, el porcentaje de fertilización disminuye (no supera el 20 %), y por encima de la temperatura óptima, para obtener buenos porcentajes de fertilización (80 %) se deben utilizar gametos de máximo 1 hora de vida. Así mismo la edad del espermatozoide afecta a la fertilización (Babcock y Keesing, 1999; Baker y Tyler, 2001).

La relación entre el tamaño del huevo y la tasa de fertilización ha sido estudiado en *Haliotis rubra* (Litaay y DeSilva, 2001; Huchete *et al.*, 2004). Estos estudios muestran que más importante que el tamaño del huevo es la relación existente entre el diámetro del citoplasma y el diámetro total del huevo, y se establece una relación cuadrática entre esta relación y la tasa de fertilización.

En el Experimento V del presente trabajo se estudia el porcentaje de fertilización y el desarrollo larvario, en función de la concentración de espermatozoos utilizada para fertilizar un número dado de óvulos. Este experimento permitirá determinar la concentración óptima de espermatozoides para obtener las mejores tasas de fertilización y el mayor porcentaje de larvas normales en *Haliotis tuberculata coccinea*.

# 2

## Justificación y Objetivos



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La oreja de mar es un molusco gasterópodo herbívoro, y su cultivo se practica actualmente con éxito en varios lugares del mundo, siendo de gran importancia para la economía de muchos países (Cook y Gordon, 2010). En Canarias se encuentra la especie *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846), conocida popularmente como almeja canaria, orejón o lapa burra. Esta especie ha sufrido un elevado esfuerzo marisquero, debido a su elevada cotización en el mercado local, y este hecho junto a la degradación ambiental de las costas canarias, han causado un decrecimiento de las poblaciones naturales. Hoy en día se encuentra incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias en la categoría de "especie vulnerable" (BOC-2001/097). Sin embargo, actualmente se está elaborando un nuevo Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas (BOE-2011/043) y el actual gobierno de Canarias tiene previsto catalogar *Haliotis tuberculata coccinea* en la categoría de "interés para los ecosistemas canarios".

Desde el punto de vista de la acuicultura, la almeja canaria es una candidata idónea para el cultivo, puesto que permitiría la diversificación de las especies producidas por la acuicultura en Canarias, centrada hasta el momento en peces marinos, y desde el punto de vista medioambiental y económico ofrece la posibilidad de regeneración de un recurso marisquero tradicional, mediante programas de repoblación, tal y como se realiza en países como Canadá, Estados Unidos y Nueva Zelanda, donde a partir de su cultivo en cautiverio se obtienen semillas con las que repoblar los ambientes costeros, y recuperar así un recurso con un importante impacto económico (Fisheries y Oceans, 2002; McCormick y Brogan, 2003; Roberts *et al.*, 2007). Así mismo, cabe destacar la posibilidad de la elaboración, con la oreja de mar, de perlas mabe (semiesféricas), tal y como se realiza en Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos, Sudáfrica, Japón y México (Fundación Copec, 2005). La perla mabe producida por la oreja de mar es una perla de alto calibre, con un tamaño entre 8 y 12 cm de diámetro, 3 mm en grosor de nácar y con un brillo irisado (Fundación Copec, 2005).

Es importante destacar otro efecto beneficioso, que el cultivo de oreja de mar puede desempeñar desde un punto de vista medioambiental, considerando que su alimento durante las fases de acondicionamiento de reproductores y engorde, está constituido por macroalgas, cuya producción en un sistema integrado por cultivo de peces–cultivo de macroalgas–cultivo de oreja de mar, o también integrado por cultivo de oreja de mar–cultivo de macroalgas–cultivo de oreja de mar, ha demostrado su eficacia en la eliminación de gran parte de los nutrientes

presentes en los efluentes procedentes de granjas marinas (Cohen y Neori, 1991; Neori *et al.*, 2000; Robertson-Andersson *et al.*, 2008).

El Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA) del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) y de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) mediante varios proyectos de investigación, entre los cuales se encuentra el proyecto titulado "Cultivo y gestión de la oreja de mar *Haliotis tuberculata spp*" con referencia 55172 y financiado por la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), ha demostrado la viabilidad del cultivo de *Haliotis tuberculata coccinea* y la posibilidad de su producción industrial. Parte de las experiencias realizadas en este proyecto se recogen en el presente trabajo que tiene como objetivo principal ampliar el conocimiento existente sobre el manejo de reproductores y la reproducción de *Haliotis tuberculata coccinea*. Este trabajo permitirá determinar el proceso oogénico a nivel celular, determinar el ciclo reproductivo en la naturaleza y estimar la fecundidad potencial para la valoración de la talla óptima de acondicionamiento (Experimento I). Diseñar una dieta adecuada durante el acondicionamiento de reproductores (Experimento II). Establecer un protocolo de anestesia en las tareas rutinarias de manejo de los ejemplares y para el control de parásitos externos de los reproductores (Experimento III y IV). Verificar si la asignación macroscópica del estado de madurez sexual se corresponde con lo observado a nivel microscópico, determinar la concentración óptima de esperma en la fertilización, así como, observar la viabilidad de la inducción a la puesta en un ciclo anual (Experimento V).



# 3

## Material y Métodos Generales





## 2.1. TANQUES EXPERIMENTALES

### 2.1.1. Tanques de 60 l

Estos tanques eran de plástico, circulares de color negro, de 60 l de capacidad, y se utilizaron para el acondicionamiento de reproductores (Figura 10). Se dispusieron en una estantería en dos alturas. Se colocó una cesta de plástico azul perforada suspendida en el tanque y separada del fondo lo que permitió separar las heces y restos de comida de los reproductores, y facilitó las labores de limpieza de tanques. En el fondo de la cesta se colocaron tejas de PVC, que proporcionaron a los individuos refugio. Así mismo, se colocó encima de cada tanque una malla negra de invernadero lo que proporcionó a los reproductores una adecuada protección a la luz.

Los tanques estaban dotados de un sistema de circuito abierto, el agua, sin filtrar, era conducida por una tubería de PVC de 40 mm de diámetro. La entrada en cada tanque era superior a través de un tubo de polipropileno de 10 mm de diámetro y se regulaba mediante una llave. La renovación diaria fue de aproximadamente de 48 veces el volumen del tanque. El nivel de agua se controló con un tubo de nivel exterior al tanque.

Cada uno de los tanques fue provisto de un tubo aireador de polietileno de 16 mm de diámetro perforado y conectado a una tubería general de polietileno de 32 mm de diámetro. El sistema de aireación disponía de llaves de plástico que permitieron regular la entrada de aire.



**Figura 10** Tanques de 60 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas. Izquierda: vista frontal, tanques dispuestos en la estantería. Derecha: vista superior, detalle de un tanque que contiene la cesta perforada, un refugio y macroalgas (Fotografía de la autora).

### 2.1.2. Tanques de 1500 l

Éstos eran de plástico blanco, circulares y de 1500 l de capacidad (Figura 11) y se utilizaron para la producción de algas para alimentación de los reproductores. El agua, rica en nutrientes, se bombeó desde el tanque de decantación que recoge los efluentes de la nave de cultivos del ICCM, con una bomba de 150 cv (Kripsol tipo M3, Toledo, España). El agua entró sin filtrar a través de una tubería de polietileno de 40 mm de diámetro, y su caudal se regulaba con una llave de PVC de 40 mm de diámetro. El rebose de los tanques tuvo lugar por la parte superior, para ello, se colocó un tubo de PVC perforado en el interior del tanque conectado a otro de PVC de 63 mm de diámetro en el exterior, que desembocaba en una canaleta general. La renovación se mantuvo en aproximadamente 24 volúmenes al día. El suministro de aire se realizó desde el fondo, mediante una manguera perforada de 16 mm de diámetro y se regulaba con una llave de polietileno de 16 mm de diámetro.

La cosecha de las algas producidas se realizó a través de una llave de PVC de 90 mm de diámetro situada en el fondo del tanque. En el caso del cultivo de *Gracilaria cornea* (alga roja), los tanques fueron tapados con una tapa de plástico blanco con el propósito de reducir la intensidad lumínica.



**Figura 11** Tanques de 1500 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Fotografía de la autora).

### 2.1.3. Tanques de 90 l

Estos tanques eran circulares de color blanco y 90 l de capacidad y se utilizaron para modificar el contenido de proteína de *Gracilaria cornea* mediante el uso de fertilizantes (Figura

12). Los tanques se dispusieron en una plataforma de madera dentro del invernadero del cultivo de post-larvas. El agua que se bombeó del tanque que recoge los efluentes de la nave de cultivos del ICCM, se suministró sin filtrar a través de una tubería de PVC de 40 mm de diámetro, entró en cada tanque por la parte superior, y se reguló por una llave de 20 mm de diámetro. El nivel de agua se mantuvo con una salida de 32 mm de diámetro, situada en la parte superior de los tanques y a través de una manguera que desembocaba en una canaleta general. La renovación se mantuvo aproximadamente en 4 volúmenes al día.

El suministro de aire se realizó desde el fondo, mediante una manguera perforada de 16 mm de diámetro, y se regulaba con una llave de polietileno de 16 mm de diámetro.

#### **2.1.4. Tanques de 50 l**

Estos tanques se utilizaron para el mantenimiento de reproductores (en algunos casos), y para la inducción a la puesta por el método de agua irradiada con radiación ultravioleta (Figura 13). Los tanques eran rectangulares de plástico azul y 50 l de capacidad, y se dispusieron en una plataforma de madera. Se introdujeron dos tejas de PVC a modo de refugios en cada tanque que fueron cubiertos con una malla negra para proporcionar a los reproductores una adecuada protección a la luz.

El agua fue filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$ , e irradiada con radiación ultravioleta a través de un esterilizador (Wedeco GmbH D-4900, Herford, Alemania). El agua se condujo a través de una tubería de PVC de 40 mm de diámetro y fue distribuida en cada tanque, por la parte superior y regulada con una llave de 20 mm de diámetro de PVC. La renovación fue de aproximadamente 5 volúmenes al día. La salida del agua se realizó por debajo de los tanques, conectado esta salida a un tubo de nivel, exterior al tanque, de 32 mm de diámetro de PVC. El desagüe de todos los tanques se realizó sobre una canaleta.

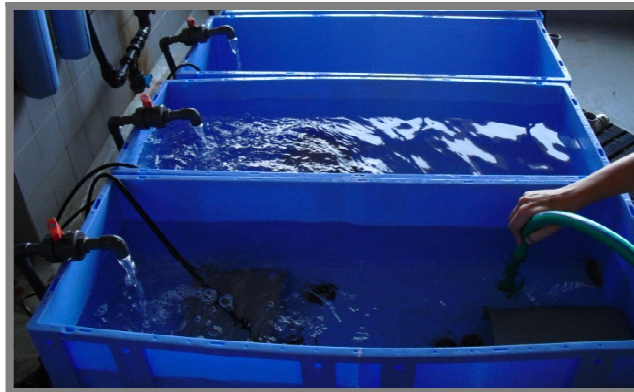
Cada uno de los tanques fue provisto de un tubo aireador de polietileno de 16 mm de diámetro perforado y conectado a una tubería general de polietileno de 32 mm de diámetro. El sistema de aireación disponía de llaves de plástico que permitieron regular el flujo.

#### **2.1.5. Cubetas de 2 l**

Las cubetas se utilizaron en el experimento del control de parásitos externos, y como recipientes en la inducción a la puesta por el método de peróxido de hidrógeno. Estas cubetas eran de plástico transparente y de 2 l de capacidad. En cada cubeta se dispusieron dos tejas de PVC a modo de refugio.



**Figura 12** Tanques de 90 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas. Izquierda: vista lateral, tanques dispuestos en la plataforma. Derecha: vista cenital, detalle de la entrada y salida del agua (Fotografía de la autora).



**Figura 13** Tanques de 50 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Fotografía de la autora).



**Figura 14** Cubetas de 2 l en el Instituto Canario de Ciencias Marinas. Izquierda: vista frontal. Derecha: detalle de los animales en sus refugios en las cubetas (Fotografía de la autora).

### 2.1.6. Agua de mar

La toma de agua de mar se realizaba a través de un pozo de captación excavado en el espigón del Muelle de Taliarte. El agua era elevada mediante un grupo de bombas que suministraba un caudal de 180 m<sup>3</sup> por hora, y era conducida hasta un depósito regulador principal situado en el exterior en una zona anexa a las instalaciones propias de la planta de cultivo. Todo el sistema de conducción de agua de mar estaba montado en PVC. Desde este depósito el agua de mar era distribuida directamente, por gravedad, a los tanques experimentales de reproductores. La salinidad y el pH del agua de los tanques de reproductores se mantuvieron aproximadamente en 36,70 ‰ y 8 respectivamente.

### 2.1.7. Aireación

El suministro de aire a toda la instalación, para conseguir una oxigenación adecuada del agua, se realizaba mediante tres turbinas ventiladoras (Siemens-Elmo, Alemania), de funcionamiento continuo que suministran aire a baja presión.

## 2.2. CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.2.1. Producción de alimento

En los tanques de 1500 l se cultivaron *Gracilaria cornea* y *Ulva rigida* con el fin de producir el alimento para los reproductores. La densidad de inoculación fue de 6 g/l para *Gracilaria cornea* y 3 g/l para *Ulva rigida*. Cada dos semanas se cosechó toda la biomasa algal, se eliminó el exceso de agua del alga, se limpió el tanque y se volvió a inocular en la misma densidad inicial. Regularmente fueron eliminados manualmente los epífitos de las algas.

En el experimento de nutrición (Experimento II), la macroalga *Gracilaria cornea* fue cultivada en los tanques de 90 l. Los tanques se inocularon a un densidad de 1000 g de *Gracilaria cornea* en 90 l de agua. Con el objetivo de conseguir diferentes niveles de proteína en el alga, en cada tanque se realizaron pulsos de fertilización con amonio (sulfato amónico, Canarias Explosivos S.A.) y con fósforo (fósforo monopotásico, Kemira) 3 días a la semana. Para ello, se cerró el flujo de agua durante 6–8 horas y se añadieron las siguientes concentraciones en cada tanque: 33.3 mg/ l<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> y 3.3 mg l<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 mg l<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> y 1.1 mg l<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.1 mg l<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> y 0.1 mg l<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Cada dos semanas se cosechó toda la biomasa algal, se eliminó el exceso de agua del alga, se limpió el tanque y se volvió a inocular con la misma densidad inicial. Regularmente los epífitos de *Gracilaria cornea* fueron eliminados manualmente.

### **2.2.2. Mantenimiento de los reproductores**

En el presente trabajo, el mantenimiento de reproductores se ha realizado con una densidad de 10 animales por tanque (en los tanques de 50 l y 60 l). La alimentación consistió en macroalgas frescas (*Gracilaria cornea* y *Ulva rígida*) cultivadas en los tanques de 1500 l, excepto en el Experimento II que se utilizó únicamente *Gracilaria cornea*. La limpieza y alimentación se realizaron una vez por semana. Este día se vaciaron los tanques, se eliminó el alimento no ingerido, se limpió el tanque con agua dulce y se introdujeron las macroalgas frescas. La temperatura del agua y el fotoperiodo no se modificaron.

## **2.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los resultados obtenidos se han expresado siempre como media  $\pm$  desviación estándar de la media. Los datos de un mismo experimento se compararon estadísticamente utilizando el análisis de la varianza (ANOVA). Una vez habían sido detectadas diferencias estadísticamente significativas con el ANOVA, las diferencias entre medias fueron puestas de manifiesto mediante el test de comparación múltiple de las medias de Tukey (como criterio general se tomó el 5 % de nivel de significación) (Sokal y Rohlf, 1996). Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS (versión 3.1 Plus for Windows; Graphical Software Systems, Inc. USA). Para correlacionar dos variables, se utilizaron regresiones lineales y polinomiales (Sokal y Rohlf, 1996).

En el caso del estudio de la población natural, Experimento I, las diferencias entre medias fueron puestas de manifiesto mediante el test de comparación Kolmogorov-Smirnov y el test t-Student. El estudio de crecimiento se realizó mediante el método descrito por Pauly (1983) mediante el programa informático FAO-ICLARM Stocks Assessment Tools (FISAT), versión 1.2)

## **2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS DE COMPOSICIÓN**

Los análisis de composición se realizaron en el laboratorio del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). En el Experimento II, se diseccionaron los animales al finalizar el experimento de nutrición. Se tomaron muestras de gónada, vísceras y músculo del pie. Estas muestras se lavaron cuidadosamente con agua destilada. Posteriormente fueron secadas con papel de filtro y guardadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de nitrógeno. También se guardaron muestras de las algas

utilizadas como dieta, y antes de los análisis, fueron liofilizadas 24 horas en el liofilizador Cryodos-50 (Telstar, España).

En este apartado se describen los métodos de análisis utilizados con las diferentes muestras. Todos los análisis se hicieron por triplicado para asegurar un mínimo error analítico en los datos obtenidos. Las muestras se homogenizaron manualmente o con el homogenizador Pulverisette 6 (Telstar, España).

### **2.4.1. Humedad**

La humedad de las muestras se determinó por desecación en estufa a 105 °C, hasta obtener peso constante, según el método de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC, 2005).

### **2.4.2. Ceniza**

El contenido en ceniza fue determinado mediante la incineración de la muestra en horno de mufla a 450 °C, hasta peso constante según el método de la AOAC (2005).

### **2.4.3. Proteínas**

El contenido en proteínas (AOAC, 2005) se calculó a partir de la composición en nitrógeno total de las muestras determinada mediante la técnica Kjeldhal. El método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado a 400 °C, en presencia de un catalizador de mercurio con el aparato Tecator Digester 20 (Foss, Suecia), seguido de una destilación con Na(OH) al 40%, con ácido bórico como sustancia receptora, en una unidad destiladora Kjeltac 2100 (Foss, Suecia). Por último se realiza una valoración con HCl 0,1 N. La conversión a porcentaje de proteína bruta se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteínas} = (V - P) \times N \times P_m \times F / M$$

Donde: V es el volumen de HCl usado en la valoración en ml; P es la media de la valoración de los patrones en ml; N es la normalidad de HCl; P<sub>m</sub> es el peso molecular del nitrógeno que es 14,007; F es el factor de conversión empírico que tiene un valor de 6,25; M es el peso de la muestra en mg.

### **2.4.4. Lípidos**

El contenido en lípidos totales de las muestras fue determinado mediante el método descrito por Folch *et al.* (1957), haciendo uso de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1

volumen/volumen) conteniendo 0,01 % de BHT. Por decantación se separan las fases acuosa y orgánica, el contenido de lípidos totales de la muestra, se determina después de la evaporación completa del cloroformo con una corriente de nitrógeno. Los lípidos se guardaron a -80 °C, en viales etiquetados, disueltos en cloroformo y en atmosfera de nitrógeno para evitar la oxidación.

Para la determinación de ácidos grasos, los lípidos obtenidos por el método de Folch *et al.* (1957) se transesterificaron con ácido sulfúrico al 1% en metanol (Christie, 1982), y se añadió tolueno para favorecer la disolución de los lípidos neutros, diluyendo los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) en hexano a una concentración de 20 mg por ml de hexano. Los ésteres metílicos fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases, con el aparato Shimadzu GC-14A (Kyoto, Japón).

## 2.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Los análisis histológicos se realizaron en el laboratorio del IUSA. En los experimentos I y II del presente trabajo, las muestras de gónadas fueron cuidadosamente diseccionadas y fijadas en formol al 10 % por al menos 24 horas. Posteriormente las muestras fueron introducidas en casetes, que permitieron el paso de los reactivos sin la pérdida de muestra y fueron lavadas durante 30 minutos en agua. A continuación tuvo lugar un proceso con una duración de 24 horas, donde las muestras son deshidratadas en alcohol ascendente, transferidas a xilol e infiltradas en parafina. Todo ello en un procesador de tejidos Histokinette 2000 (Leica, Nussloch, Alemania).

### **Deshidratación**

Alcohol 70 %	60 minutos
Alcohol 80 %	90 minutos
Alcohol 90 %	90 minutos
Alcohol 96 %	90 minutos
Alcohol absoluto I	90 minutos
Alcohol absoluto II	120 minutos
Alcohol absoluto III	120 minutos

### **Clarificado**

Xilol I	30 minutos
Xilol II	30 minutos
Xilol III	60 minutos



## **Infiltración en parafina**

Parafina I	3 horas
Parafina II	6 horas
Parafina en Vacío	1 hora

Posteriormente fueron incluidas en un dispensador de parafina Jung Histoembedder (Leica, Nussloch, Alemania).

Los bloques fueron conservados en el congelador, para ser tallados primeramente a 15 – 20  $\mu\text{m}$ , enfriados nuevamente y posteriormente se realizaron cortes a 4 – 5  $\mu\text{m}$  en un micrótomo de rotación Jung Autocut 2055 (Leica, Nussloch, Alemania). Los cortes fueron recogidos en un baño de flotación con agua destilada a 45 °C.

Los portaobjetos con los cortes de la muestra fueron secados en estufa (1 hora a 60 °C). Las preparaciones fueron posteriormente inmersas en xilol e hidratadas en alcohol descendiente hasta llegar a agua, según el siguiente protocolo:

Xilol	15 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol 96 %	5 minutos
Alcohol 90 %	5 minutos
Alcohol 70 %	5 minutos
Agua	5 minutos

Una vez terminado el proceso anterior se realizó la tinción Hematoxilina – Eosina (Socorro, 2006). Se introdujeron los portas con las muestras en cubetas que contenían:

Hematoxilina de Harris	15 – 20 minutos
Alcohol ácido	3 baños cortos
Lavado en agua	
Agua amoniacal	20 segundos
Agua continua	15 minutos
Eosina de Puttis	3 – 4 minutos
Lavado en agua	

Tras la tinción se procedió a la deshidratación y clarificado de las preparaciones, de acuerdo con el siguiente protocolo:

Alcohol 96 %	5 minutos
Alcohol 100 %	10 minutos

Alcohol 100 %	5 minutos
Xilol	5 minutos
Xilol	5 minutos

Se colocó una gota de resina sintética (Eukkit) sobre cada cubre-objeto, montando el portaobjeto sobre el cubre, presionando hasta eliminar cualquier burbuja de aire. Las preparaciones se dejaron secar al aire, fueron etiquetadas y conservadas posteriormente en un lugar fresco y sombrío.

Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en un fotomicroscopio Leica modelo DMBE.

## 2.6. INDUCCIÓN A LA PUESTA

La inducción a la puesta se realizó siguiendo los métodos del peróxido de hidrógeno y el de agua irradiada con radiación ultravioleta.

### 2.6.1. Método de Peróxido de Hidrógeno

Este método fue descrito por Morse *et al.* (1977) y fue modificado para *Haliotis tuberculata coccinea* por Peña (1986).

#### Material empleado

Cubos de plástico de 15 l de capacidad, cubetas de 2 l de capacidad, agua de mar filtrada a 1 y 0,35  $\mu\text{m}$  y esterilizada con radiación ultravioleta, tamiz de malla de 312  $\mu\text{m}$  y 62  $\mu\text{m}$ , pipeta de 5 ml para tomar muestras, lupa.

#### Preparación de los reactivos

Preparación del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 6%: Se preparó a partir de peróxido de hidrógeno al 33%, mediante la disolución de 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% en 80 ml de agua destilada. La preparación se mantuvo entre 0 – 4 °C.

Preparación del buffer: Se preparó un buffer con el objetivo de aumentar el pH hasta 9.1 en el agua donde se indujo la puesta. Para ello, se disolvieron 24,2 g de Tris en 75 ml de agua destilada y una vez disuelto se llevó hasta un volumen final de 100 ml.

#### Procedimiento

Las hembras se indujeron 30 min antes que los machos con el objetivo de sincronizar la puesta en ambos sexos, según las recomendaciones realizadas por Peña (1986). Los

reproductores se dispusieron, separados por sexos, en las cubetas de de 2 l con agua de mar filtrada a 0,35 y 1  $\mu\text{m}$  y esterilizada con radiación ultravioleta. Se añadió el buffer (6,6 ml / l de agua de mar) y 15 minutos más tarde, se añadió el peróxido de hidrógeno (4 ml / l de agua de mar). Se dejaron los reproductores en oscuridad el tiempo necesario para que comenzasen a expulsar los gametos, descartándose los primeros huevos. Inmediatamente después de observarse los primeros gametos, los reproductores se sacaron del agua que contenía los reactivos y se lavaron así como las cubetas de experimentación. Los reproductores se dispusieron de nuevo en las cubetas limpias de reactivos. Una vez obtenidos los gametos suficientes, los huevos se sifonaron, se pasaron por un tamiz de 312  $\mu\text{m}$  para eliminar las impurezas y dispusieron en un cubo de plástico de 10 l de agua filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$  y esterilizada con radiación ultravioleta. Posteriormente, se procedió al contaje de los huevos en muestras de 3 ml bajo la lupa. La fertilización se realizó añadiendo espermatozoides hasta una concentración de  $10^5$  espermatozoides / l (Clavier, 1992b). Transcurridos 30 minutos, los huevos ya fertilizados se pasaron por un tamiz de 62  $\mu\text{m}$  para eliminar el exceso de esperma y se enjuagaron (siempre sumergidos en agua) cuidadosamente con agua filtrada a 1  $\mu\text{m}$ , y esterilizada con radiación ultravioleta continuamente. Tras una hora, se estimó el porcentaje de fertilización. Para ello, se procedió al contaje de los huevos fecundados en muestras de 3 ml bajo la lupa.

### **2.6.2. Método de Agua Irradiada con Radiación Ultravioleta**

Este método fue descrito por Kikuchi y Uki (1974a) y fue adaptado para realizarse en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas.

#### **Material empleado**

Cubos de plástico de 15 l de capacidad, cubetas de 2 l de capacidad, agua de mar filtrada a 1 y 0,35  $\mu\text{m}$  y tratada con radiación ultravioleta, tamiz de malla de 312  $\mu\text{m}$  y 62  $\mu\text{m}$ , pipeta de 5 ml para tomar muestras, lupa.

#### **Procedimiento**

Los reproductores se dispusieron por sexos separados en los tanques de 50 l en circuito abierto, y a las 15:00 horas se encendió el aparato esterilizador que contenía la lámpara ultravioleta (Sefiltra 1x48H022PE, Madrid, España), de tal manera que el agua suministrada a los tanques de 50 l era continuamente irradiada con radiación ultravioleta. Al atardecer o en las primeras horas de la noche (entre las 20:00 y 21:30 horas) comenzó la expulsión de gametos, cerrándose en ese momento el suministro de agua a los tanques. Una vez obtenidos los

gametos suficientes, los huevos se sifonaron, se pasaron por un tamiz de 312  $\mu\text{m}$  para eliminar las impurezas y dispusieron en un cubo de plástico de 10 l de agua filtrada hasta 1  $\mu\text{m}$  y esterilizada con radiación ultravioleta. Posteriormente, se procedió al conteo de los huevos en muestras de 3 ml bajo la lupa. La fertilización se realizó añadiendo espermatozoides hasta una concentración de  $10^5$  espermatozoides / l (Clavier, 1992b). Transcurridos 30 minutos, los huevos ya fertilizados se pasaron por un tamiz de 62  $\mu\text{m}$  para eliminar el exceso de esperma y se enjuagaron (siempre sumergidos en agua) cuidadosamente con agua filtrada a 1  $\mu\text{m}$  y esterilizada con radiación ultravioleta continuamente. Tras una hora, se estimó el porcentaje de fertilización. Para ello, se procedió al conteo de los huevos fecundados en muestras de 3 ml bajo la lupa.



# 4

## Resultados y Discusión





## 4.1. Experimento I

### Reproducción, Fecundidad y Crecimiento en el Medio Natural



Este experimento fue publicado en 2010 por Bilbao, A., V. Tuset, M. Viera, G. Courtois De Vicoise, H. Fernández-Palacios, R. Haroun y M. Izquierdo con el título de "Reproduction, Fecundity, and Growth of Abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve 1846) in the Canary Islands" en el volumen 29 (4) de la revista Journal of Shellfish Research.

Los resultados preliminares de este experimento fueron presentados como poster en 2006 por Bilbao A., M.P. Viera, G. Courtois de Vicoise, H. Fernández-Palacios y M.S. Izquierdo con el título de "Gonadal cycle of reproductive females and fecundity study of Canarian abalone, *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve" en el congreso VI Internacional Abalone Symposium en Puerto Varas, Chile.



### 4.1.1. INTRODUCTION

The reproductive seasonality of several abalone species from various regions in the world has been studied (Booolootian *et al.*, 1962; Tomita, 1967; Newman, 1967; Webber and Giese, 1969; Poore, 1970; Young and DeMartini, 1970; Hayashi, 1980a; Tutschulte and Connell, 1981; Capinpin *et al.*, 1998; Fukuzawa *et al.*, 2007). Most of the studies mentioned here have contributed to the development and improvement of the artificial propagation techniques for a number of abalone species, as well as to the growth of abalone aquaculture around the world (e.g. *Haliotis discus hannai* and *Haliotis rufescens*).

Ormer *Haliotis tuberculata tuberculata* Linnaeus (1758) is currently the only commercial abalone species in Europe. It was considered as a potential candidate for aquaculture development in the 1970s in France, and its commercial fishing and culture interest significantly increased all through Europe during the early 1990s as a result of much easier international trade (rapid transport and market globalization) and an increase in its value in Asian markets (Huchette and Clavier, 2004). New practices for the production of juveniles have recently emerged and enabled a rapid expansion of this industry (Daume *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2004). Ireland and the Channel Islands (Huchette and Clavier, 2004), Scotland (Kelly and Owen 2002), and France are currently the only established producing countries. Spain has also carried out some experimental culture trials.

A subspecies of ormer, *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve (1846), lies in the Macaronesian region (Geiger, 2000). In the Canary Islands, it has a patchy distribution on exposed and semiexposed areas from low intertidal to subtidal depths, shallower than 15 m, with an affinity for specific habitats (Nuñez *et al.*, 1994; Espino and Herrera, 2002). Coralline red algae are generally considered to provide an optimum substratum for larval settlement and metamorphosis (Morse and Morse, 1984). In fact, Espino and Herrera (2002) found high densities of *Haliotis tuberculata coccinea* juveniles and adults on rock surfaces encrusted with red coralline algae. Furthermore, this habitat is closely linked to a regular supply of drifting algae carried by the currents. The amount of such drifting algae determines the abalone population density where its habitat is suitable (Clavier and Chardy, 1989).

This subspecies have been overexploited because of its high social and economic value. After Nuñez *et al.* (1994) and Espino and Herrera (2002), it has been classified as an endangered species in the Catalogue of Threatened Species of the Canary Islands (BOC-2001/097). These studies have assessed some populations around the islands and concluded that this subspecies cannot withstand the fishing pressure in the Canaries. Recently, the government of the Canary

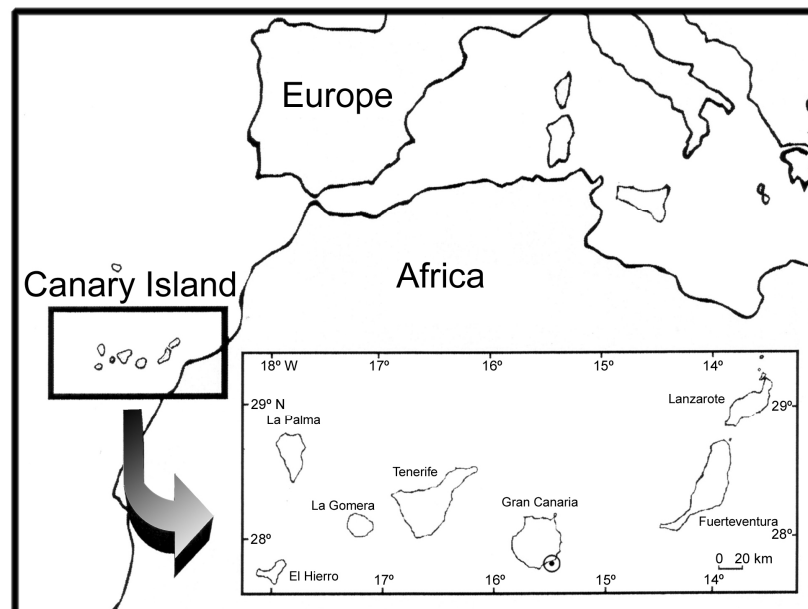
Islands has shown interest in restocking this natural ecosystem and considered *Haliotis tuberculata coccinea* as a new species for the diversification of local commercial aquaculture. Its artificial spawning induction was studied by Peña (1986) and more recently, to improve knowledge about its culture, embryology, complete larval development, and juvenile nutrition requirements have also been described (Viera *et al.*, 2005; Courtois de Vicose *et al.*, 2007).

This study aims to provide more accurate biological information on sexuality, reproduction, fecundity, and growth of this species. This knowledge, when applied to hatchery-related activities, may improve the culture of this species and is essential to studying restocking in natural ecosystems.

## 4.1.2. MATERIALS AND METHODS

### Sampling

Monthly samples of 20 individuals were collected during the day by diving between June 2005 and May 2007 at a depth shallower than 10 m at El Castillo del Romeral Bay, Gran Canaria Island (Figure 15). Total shell length to the nearest 0.5 mm and total body weight to the nearest 0.1 g were taken for each specimen. Conical appendages, consisting of the digestive gland and the surrounding gonad, were carefully removed and weighted to the nearest 0.001 g.



**Figure 15** Location of sampling area of abalone specimens from the Canary Islands (eastern–central Atlantic).

## **Ovary morphology**

The basal, middle and apical regions (Young and DeMartini, 1970) of the conical appendage were fixed in 10% buffered formaldehyde for histological study. After 24-48 hours, they were dehydrated, embedded in paraffin wax, sectioned into cross-sections (4 - 5  $\mu\text{m}$  thick), and stained with Harris'hematoxylin-eosin stain. Three regions of conical appendages were observed microscopically to determinate the oogenetic processes in female gonads. Oocyte stages were assigned according to Apisawetakan *et al.* (2001).

## **Sexuality and spawning season**

Sex and maturity stages (MS) of gonad were assigned according to the classification described by Capinpin *et al.* (1998) (Table 1). Monthly changes in the three following variables were analyzed to determine the spawning season (Hanh, 1989):

1) Gonad bulk index (GBI) is the percentage of gonad tissue at the base of the conical appendage.

2)  $\text{GBI} = (\text{Area of the gonad in the section} / \text{Total area of the section}) \times 100$ .

3) Percentage frequency of the maturity stages (EMS).

4) Oocyte diameter (OD): Diameters of 100 oocytes were measured using Image Pro-plus software (ver. 5.0.1.). Measurements were made only of oocytes sectioned through the nucleus.

## **Fecundity**

The pattern of annual fecundity was assessed by oocyte size frequency distribution. Ripe females ranging between 37 and 47 mm in shell length in the ripe stage were selected for analysis of oocyte size frequency distribution in November and March, representing gonad development early and late during the spawning season. Because the mean size (*t*-test,  $P > 0.05$ ) was not significantly different between both samples, one frequency distribution was obtained for each month.

The gravimetric method was used to estimate batch fecundity (modified from Hayashi, 1980a). Conical appendages of 12 ripe stages females, collected in October, were isolated from gonads and weighed to the nearest 0.001 mg. Subsamples from 3 different locations (basal, middle and apical regions) of each conical appendage were weighed, and oocytes loosened from trabeculae were counted. Fecundity was defined as the number of oocytes in stages 4 and 5. To calculate the percentage of oocytes in each region, gonad was fixed in 10% buffered formaldehyde for histological study. Sections were photographed microscopically and 150

oocytes were identified in 2 groups: stages 1-3 and stages 4-5. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the relative frequency (number oocytes per gonad area) in the sample areas of conical appendage.

**Table 1** Criteria used to assess gonad development stage in *Haliotis tuberculata coccinea* (Capinpin *et al.*, 1998)

Stage	Description
1: Pre-proliferative	The gonad is essentially immature is characterized by little or no germinal epithelium between the outer epidermis and the digestive gland.
2: Proliferative	Spermatogonia cells are growing from the connective tissue tubules. Oogonia cells are growing from the trabeculae and form clusters on trabecular walls. The gonad shows vacant spaces.
3: Maturing	A layer of spermatids or spermatozoa is present in the testis. Vitellogenesis is initiated at this stage. Early maturing ovary is characterized by newly stalked oocytes measuring about 25µm. A late-maturing ovary has oocytes larger than 50 µm that extend from the trabeculae toward the digestive gland, with each attached by a stalk and is shapep like a teardrop.
4: Ripe	The testis is densely packed with spermatozoa. A few early gametogenic stages may be present, but are restricted around the tubules. The ovary has oocytes larger than 150 µm. Mature oocytes free from the trabeculae have a mean diameter of 150 µm. A slight proliferation of oocytes less than 25 µm is common, especially near the peripheral wall of the gonad.
5: Partly spawned	The testis has obvious spaces around the tubules where spermatozoa have vacated. Other areas appear as ripe. The ovary contains reduced densities of mature oocytes relative to ripe gonads. The gonad lumen is partially collapsed with folded trabeculae. A moderate number of ripe oocytes still present in some areas is densely packed.
6: Spent	A spent gonad is characterized by lack of ripe gametes and slight gametogenic activity. Macroscopically, the gonad is greatly reduced. The gonad lumen is collapsed, with folded trabeculae or tubules. A spent ovary may have few residual oocytes.

The females were divided into 3 classes according to their shell length (35-44, 45-54 and 55-64 mm) and the batch fecundity results were submitted to a statistical analysis applying a 1-

way ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons of means, at a 5% significance level ( $P < 0.05$ ).

### **Population structure**

Normality of length data was previously determined by means of the Kolmogorov-Smirnov test for comparing the mean sizes of the different study groups of abalone. The same statistical test was used for comparing different distributions of length data. The Student's  $t$ -test was applied as a non-parametric test for comparing 2 means (Zar, 1996). Carapace length-per-wet weight relationships were calculated on each sex or group with respect to the whole period studied.

The overall ratio (males to females) and the sex ratios by size intervals (2 mm) were determined considering the number of males and females. Sex ratios were tested statistically for significant deviations from the expected 1:1 ratio with a chi-square test ( $P > 0.05$ ).

### **Growth**

Length frequency data were analyzed for estimating growth in each sex by means of Pauly's method (Pauly, 1983). Length frequency was represented quarterly during 2 years to simulate the time sequence. The FAO-ICLARM Stock Assessment Tools (FISAT) program (version 1.2) was used for data processing and calculating the von Bertalanffy growth parameters. Bhattacharya's method was used for decomposition of mixtures of normal distribution. The estimation of  $L_{\infty}$  was obtained by means of Gulland and Holts' method, whereas the  $k$  value was determined using the routine ELEFAN I (Gayanilo and Pauly, 1997). For the sake of comparison, growth performance of both sexes Munro's phi prime ( $\phi' = \log k + 2 \log L_{\infty}$ ) was assessed according to Sparre *et al.* (1989).

## **4.1.3. RESULTS**

### **Ovary morphology**

The histological study revealed that the conical appendage included the conical digestive gland surrounded by the ovary, which was classified into 3 regions according to the relative importance of both tissues. In the basal region the digestive gland occupied most of the cross-section, in the medium region the ovary filled most of the cross-section, and in the apical region only ovarian tissue was found. The ovary was enclosed within 2 walls that separated the ovary from the mantle and the digestive gland. The connective tissue extended perpendicularly into the gonads to generate the trabeculae, dividing the gonad into compartments around the lumens, where oocytes were developing. The first stages of the sexual cells appeared attached

to the trabeculae, whereas mature oocytes were formed near the lumen. The trabeculae decreased in thickness as the female gonad ripened. Two phases and 6 stages of female sexual cells were recognized (Figure 16 A-E):

a) Previtellogenic phase:

Oogonia (Og): round cells with  $10.66 \pm 2.7 \mu\text{m}$  diameter, closely attached to the trabeculae, showing a highly basophilic nucleus surrounded by homogeneous basophilic cytoplasm (Figure 16A).

Stage 1 Oocyte (Oc<sub>1</sub>): oval shaped with a maximum diameter of  $26.47 \pm 6.44 \mu\text{m}$  and a minimum diameter of  $15.48 \pm 4.05 \mu\text{m}$ , strongly attached to the trabeculae, round nucleus containing a diffuse nuclear envelope, follicular cells surrounding (Figure 16B).

Stage 2 Oocyte (Oc<sub>2</sub>): elongated shaped with a maximum diameter of  $60.51 \pm 17.32 \mu\text{m}$  and a minimum diameter of  $33.15 \pm 13.04 \mu\text{m}$ , attached to the trabeculae only in the basal region, oval nucleus, first lipid droplets appear (Figure 16B, C).

b) Vitellogenic phase:

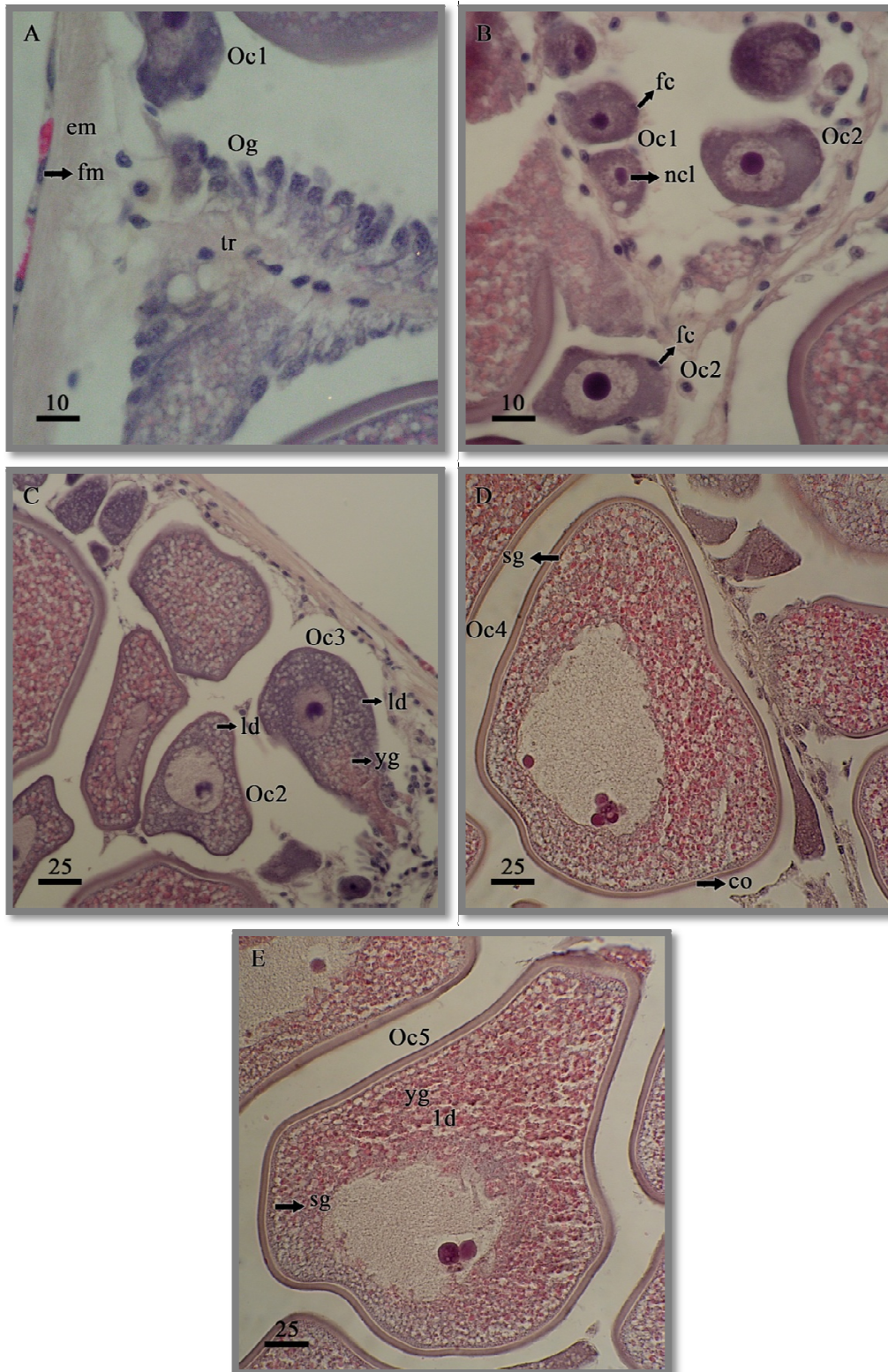
Stage 3 Oocyte (Oc<sub>3</sub>): pear shaped with a maximum diameter of  $110.30 \pm 27.63 \mu\text{m}$  and a minimum diameter of  $59.64 \pm 21.02 \mu\text{m}$ , increasing number of lipid droplets, appearance of the first yolk eosinophilic vacuoles (Figure 16C).

Stage 4 Oocyte (Oc<sub>4</sub>): polygonal shaped with a maximum diameter of  $162.25 \pm 28.76 \mu\text{m}$  and a minimum diameter of  $103.2 \pm 23.49 \mu\text{m}$ , attached to the trabeculae by a small contact surface, cytoplasm contained yolk vacuoles and numerous lipid droplets, secretory granules with basophilic propriety migrated toward the plasma membrane, follicular cells located around the narrowest part of the cell, appearance of a thin eosinophilic layer of jelly coat on the outer surface of the cell membrane (Figure 16D).

Stage 5 Oocyte (Oc<sub>5</sub>): polygonal shaped with a maximum diameter of  $171.77 \pm 28.75 \mu\text{m}$  and a minimum diameter of  $114.91 \pm 26.51 \mu\text{m}$ , oocyte is released into the lumen of the ovary, follicular cells absent, yolk vacuoles aggregated (Figure 16E).

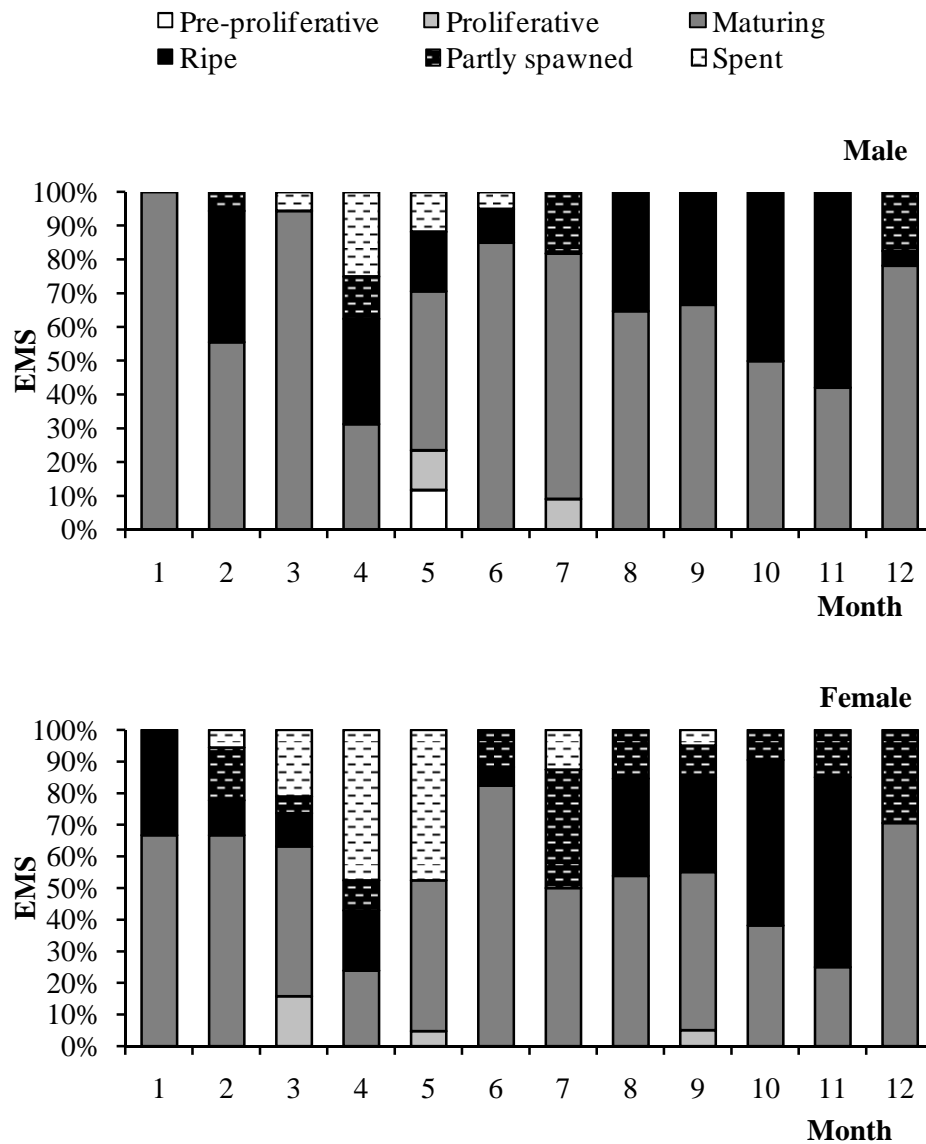
### **Sexuality and spawning season**

Of the total number of abalone examined, 207 were females and 204 males. Assignment of sex macroscopically was easy in the most cases, except in the smaller or spent gonads.



**Figure 16** Slides of ovarian *Haliotis tuberculata coccinea* tissue stained with hematoxylin–eosin. A: Oogonia (Og) attached to the capsular side of the trabeculae (tr). Ovarian epithelium (em) shows fibromuscular cells (fm). B: Oc1 contains an intense basophilic cytoplasm and a prominent nucleolus (ncl), surrounded by follicular cells (fc). Oc2 shows a clear nuclear envelope. C: Oc2 shows the lipid droplets (ld). Oc3 shows the first eosinophilic yolk granules (yg). D: Oc4 shows the secretory granules (sg) migrating toward the cell peripheries. A thin layer of homogenous jelly coat (co) recovers the outer surface of the cell membrane. E: Oc5 is surrounded by a uniformly thick jelly coat and is not attached to the trabeculae.

Maturing and ripe-stage gonads were found throughout the study period, except July, with maximum ripeness for both sexes noted in November (60%; Figure 17). Partly spawned and spent-stage individuals appeared yearlong excluding January, probably because of the few number of samples (N=11 over two years).



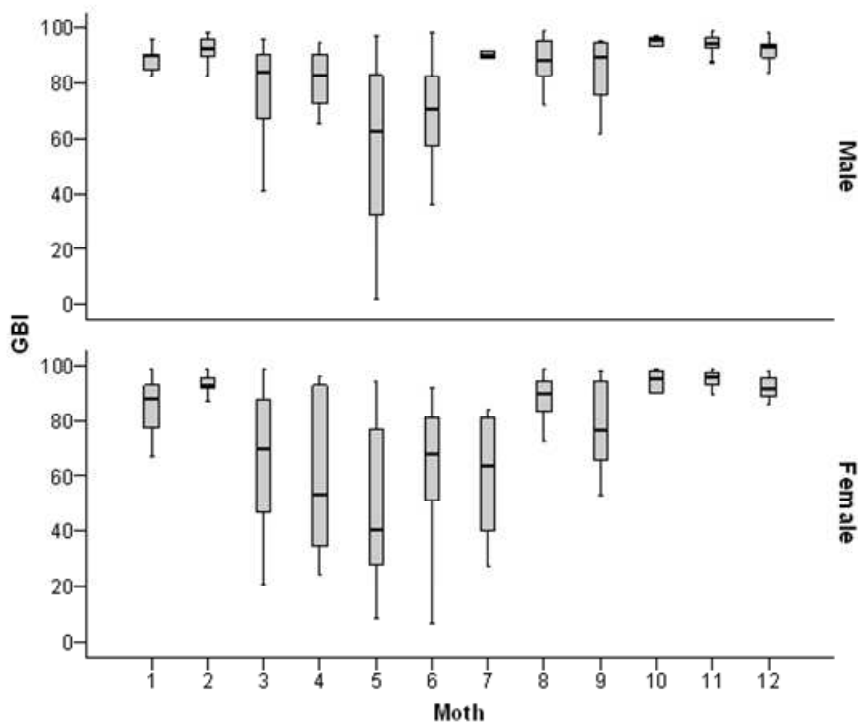
**Figure 17** Monthly changes in the percent frequency of the maturity stages (EMS) for males and females.

The changes of GBI measured at the base of the conical appendage are show in Figure 18. The highest values were observed between August and February, whereas the GBI decreased between February and May.

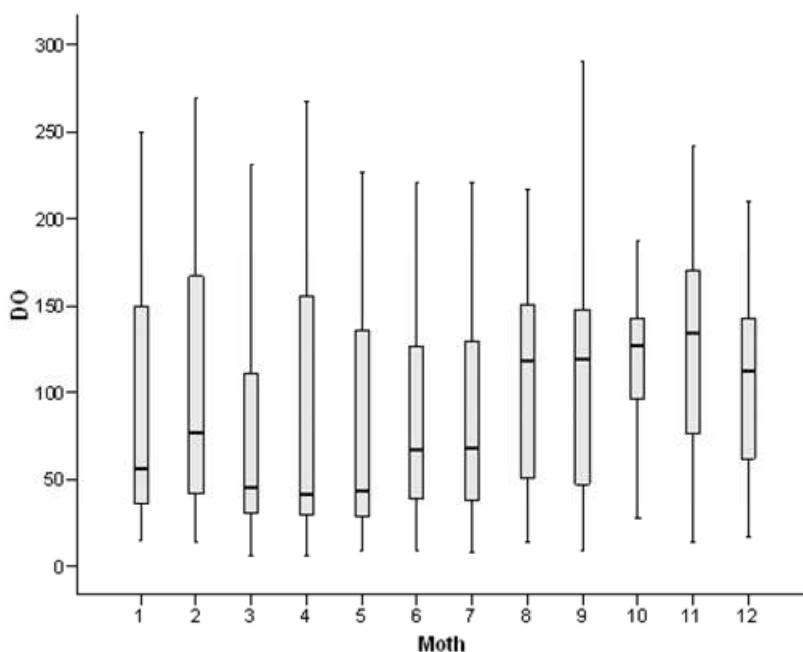


The oocyte diameter (Figure 19) indicated a similar trend to GBI, with the highest values noted between August and February and lowest values noted between March and July.

The results described here suggest an annual reproductive cycle, spawning throughout the year, although, in general, maximum activity took place between August and February.



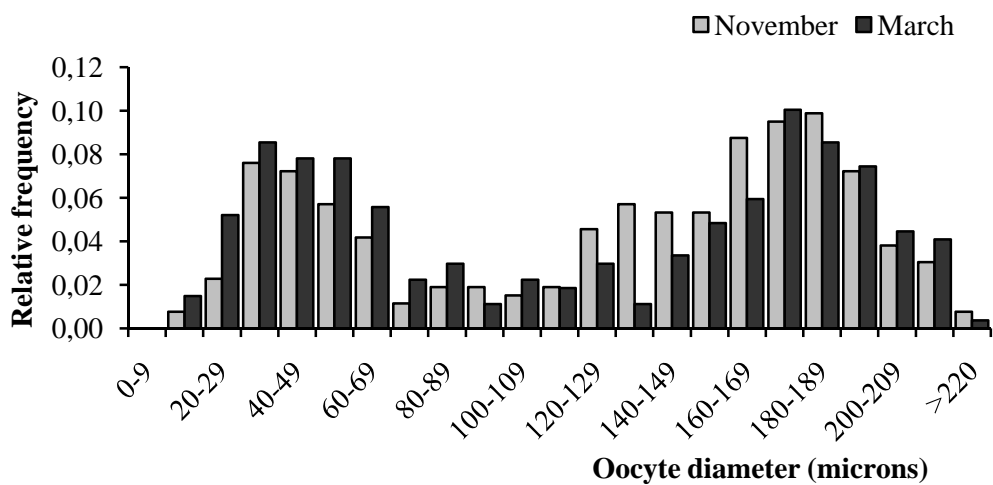
**Figure 18** Seasonal variation of the gonad bulk index (GBI) box plot.



**Figure 19** Seasonal variation of the oocytes diameter (DO) box plot.

## Batch fecundity

Oocyte size frequency distributions showed 2 populations of oocytes (Figure 20), indicating a group synchronous ovarian development. Approximately 78% of oocytes observed were in stage 4 or 5. Batch fecundity ranged from 85,749 (39 mm in shell length) to 691,456 oocytes (62 mm in shell length), with a mean of  $391,103 \pm 275,257$  oocytes. A positive association was found between fecundity and shell length ( $r^2 = 0.924$ ) and wet body weight ( $r^2 = 0,869$ ; Figure 21). Tukey's test revealed significant differences ( $P < 0.05$ ) in the mean fecundity of the highest size class (55-64 mm in shell length; Figure 22).

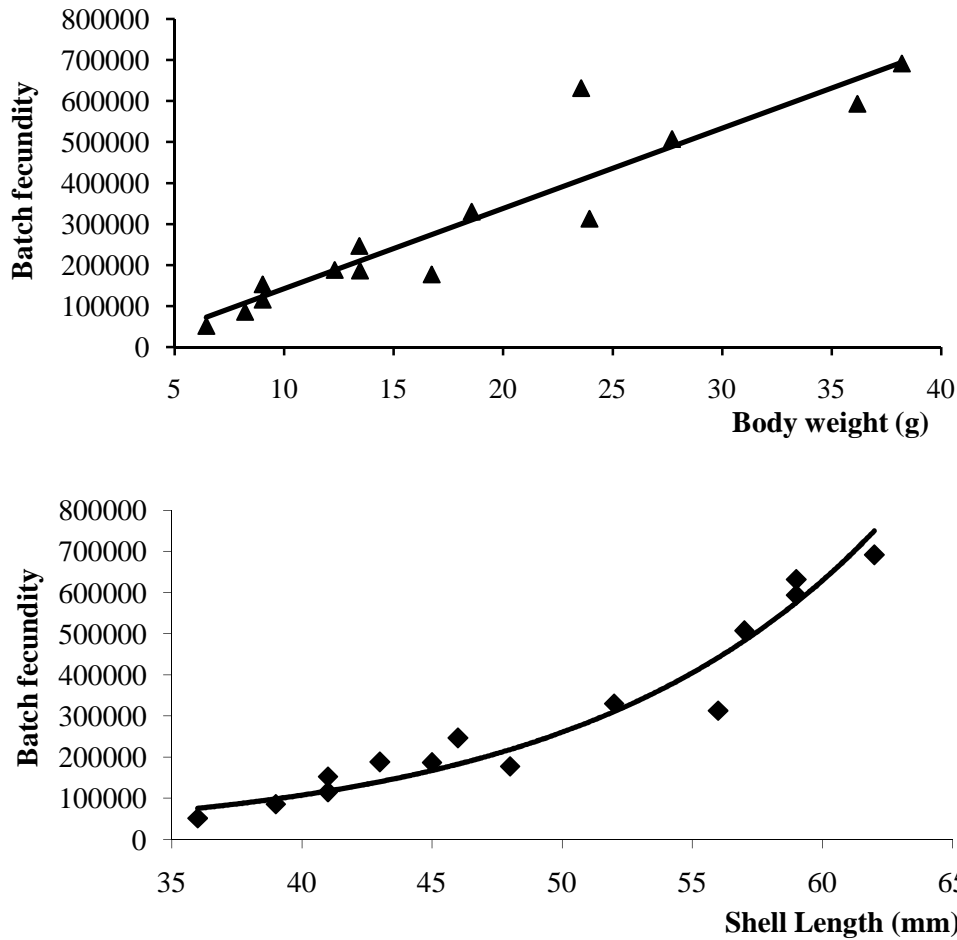


**Figure 20** Oocyte size frequency distributions in ripe gonads representing gonad development early (November) and late (March) during the spawning season.

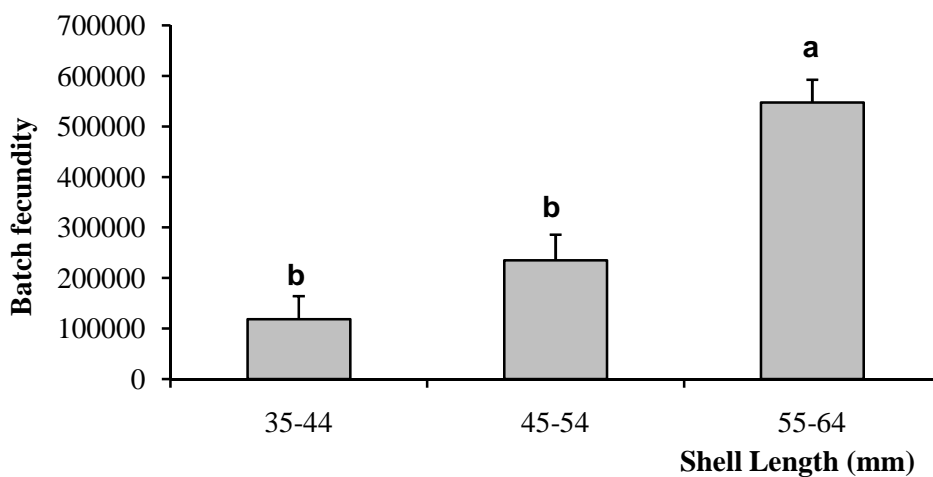
## Population structure

Females ranged from 29 – 72 mm in shell length and between 2.87 and 57.85 g in weight; males varied from 26 – 75 mm in shell length and between 1.73 and 66.30 g in weight. Student's *t*-test showed significant differences in size between sex ( $P < 0.01$ ) and the Kolmogorov-Smirnov test also indicated differences in size distribution ( $P < 0.05$ ; Figure 23). Analysis of covariance ( $F = 5.164$ ,  $P = 0.018$ ) noted significant differences by sex in the relationship of size to weight (Figure 24).

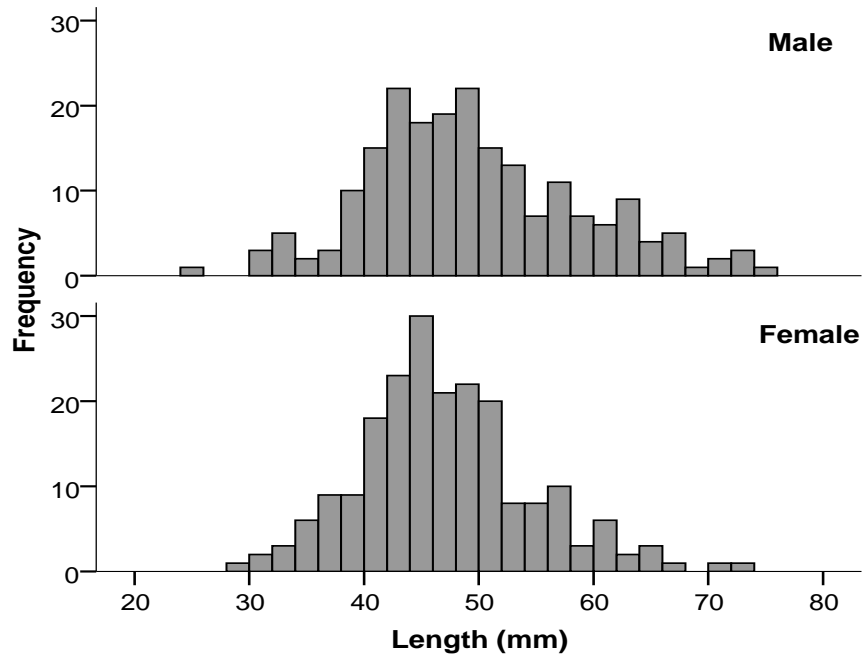
The overall ratio of males to females was 1:1.02, so the hypothesis that the sex ratio was 1:1 must be accepted ( $\chi^2 = 0.022$ ,  $P = 0.882$ ). The analysis by size class did not reveal a tendency in data.



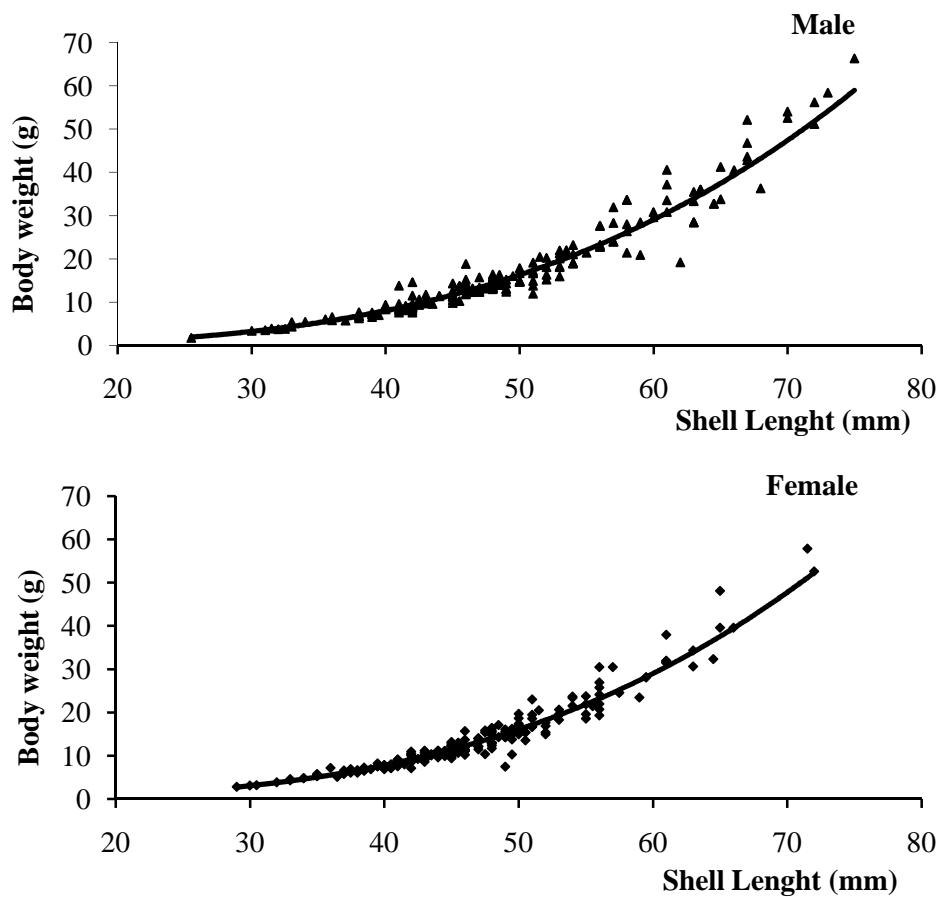
**Figure 21** Relationships between batch fecundity and shell length and body weight. The equation for shell length is  $F = 3187 e^{0.0881 \times SL}$  ( $r^2 = 0.924$ ) and for body weight is  $F = 19,546 BW - 53,497$  ( $r^2 = 0.8696$ ), where F is fecundity, SL is shell length in millimeters, and BW is body weight in grams.



**Figure 22** Batch fecundity according to shell length of ripe females. Vertical bars indicate SEM. The number of oocytes per female of 55–64 mm is significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that for females of 45–54 mm and 35–44 mm in shell length.



**Figure 23** Size frequency distribution by sex.



**Figure 24** Length-weight relationship for males (N = 204) and females (N = 207). The power equations are  $BW = 6.6 \times 10^{-5} \times SL^{3.173}$  ( $r^2 = 0.959$ ) for males and  $BW = 5.1 \times 10^{-5} \times SL^{3.23}$  ( $r^2 = 0.953$ ) for females, where BW is body weight and SL is shell length.

## Growth

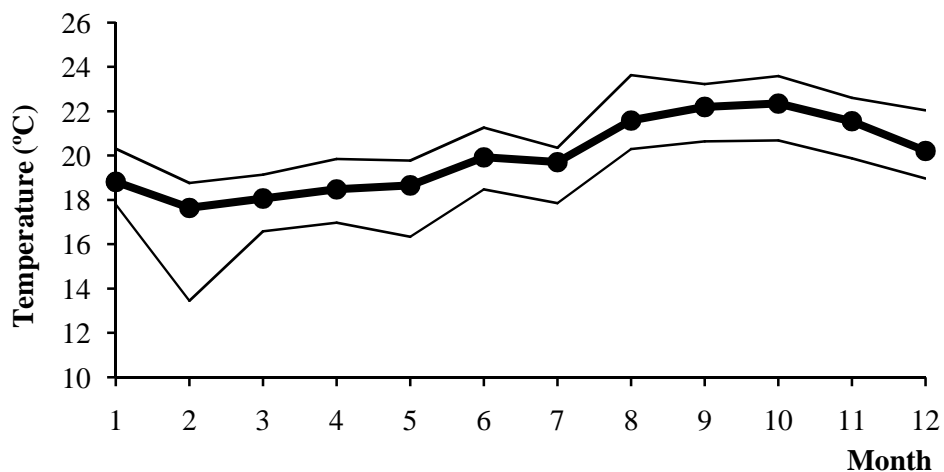
The parameters of the von Bertalanffy growth equation estimated for females and males were 72.5 and 78.8 mm in shell length of asymptotic length and 0.43 / year and 0.37 / year of growth rate, respectively. The growth performance index  $\phi'$  was very similar in both sexes: 3.35 in females and 3.36 in males.

### 4.1.4. DISCUSSION

Reproduction is an important aspect for the aquaculture of new species. To understand abalone reproduction better, the morphology of sexual cells during the oogenetic process has been studied for different abalone species, such as *Haliotis discus hannai* (Tomita, 1967; Awaji and Hamano, 2004; Fukuzawa *et al.*, 2007), *Haliotis rufescens* (Young and DeMartini, 1970; Martin *et al.*, 1983), *Haliotis diversicolor* (Takashima *et al.*, 1978), *Haliotis asinina* (Apisawetakan *et al.*, 2001) and *Haliotis tuberculata coccinea* (present study). These studies have proved that the gonadal structural organization of various abalone species is very similar. It has been also reported that oocyte development is group synchronous, observing a cohort of large oocytes and another of smaller ones (Tomita, 1967; Jebreen *et al.*, 2000; Fukazawa *et al.*, 2007; current study). These studies suggest that vitellogenic oocytes are expelled under favourable environmental conditions, whereas small cohorts of oocytes are kept in the ovarian tissues until the next spawning. However, the time elapsed between different spawning events in *Haliotis tuberculata coccinea* is still unknown. Tropical abalone, *Haliotis asinina*, is able to develop oocyte cohorts at least 3 times a year (Jebreen *et al.*, 2000), whereas *Haliotis discus hannai* develop oocyte cohorts twice a year (Fukazawa *et al.*, 2007). With regard to *Haliotis tuberculata coccinea* populations in the Canary Islands, the high values of GBI and oocyte diameter throughout the year indicate that spawning occurs yearlong. Therefore, these species can be described as partial-spawning species.

The comparative analysis of *Haliotis tuberculata* sp. spawning seasons suggests an increase in spawning periods depending on latitude. Hayashi (1980a) found that northern populations in the British Channel spawned over short periods, whereas southern populations spawned twice a year or extended the reproductive season. Likewise, *Haliotis midae*, a species found in South Africa, spawns for a short period of time between October and December (Newman, 1967). In the Canary Islands, a subtropical region, the spawning season for *Haliotis tuberculata coccinea* occurs throughout the year, with peak activity between August and February. Temperature seems to be the most important factor affecting reproduction (Newman,

1967; Girard, 1972; Hayashi, 1980a; Uki and Kikuchi, 1984; Counihan *et al.*, 2001). In the Canaries, the water temperature increase (Figure 25) starts in August (>20°C), when gonad development in the majority of the individuals in the population is observed. However, this reproductive behaviour is maintained throughout the year, and this may be related to spring tides around new or full moons (experimental observation under culture conditions). Similarly, Jebreen *et al.* (2000) observed that ovulation and spawning in a natural population of *Haliotis asinina*, a tropical species, are also associated with spring tides. Counihan *et al.* (2001), according to experiments performed with this specie under captivity conditions, suggest that tidal elements influence the spawning biology, maintaining endogenous rates that persist in nontidal environments (e.g., aquaculture installations) for at least 6 weeks; after this period, spawning continues, although irregularly.



**Figure 25** Means of surface water temperature in Castillo del Romeral Bay. The upper and lower lines indicate the maximum and minimum temperatures.

It is difficult to carry out comparisons of fecundity estimation among species and studies because the methodology used varies greatly. Some studies are based on artificial spawning induction (Peña, 1986; Clavier, 1992b), whereas others are based on rearing animals from natural population and on counting the eggs released during natural spawning (Capinpin *et al.*, 1998). Others studies are performed by the identification of mature oocytes according to their size or morphological features, calculating the fecundity based on gonad weight or volume (Hayashi, 1980a; Tutschulte and Connell, 1981; Rogers-Bennett *et al.*, 2004). The data from the current study provide a higher fecundity value than that obtained by Peña (1986), who carried out experiments in *Haliotis tuberculata coccinea* with animals collected in the Canary Islands at

temperatures between 15.3°C and 17.5°C (probably low for complete gonadal maturation). However, a comparison with other similarly-size abalone, such as *Haliotis asinina*, reveals similar fecundity estimations: 150,000-600,000 eggs (58.1-69 mm in shell length) (Capinpin *et al.*, 1998). Furthermore, it has been found that abalone fecundity increases as shell length and body weight increase (Newman, 1967; Hayashi, 1980a; Clavier, 1992b; Litaay and DeSilva, 2003; current study).

With regard to the population structure, in other words, the sex-ratio, the data found were similar to those obtained for other abalone species such as *Haliotis cracherodii*, *Haliotis rufescens* and *Haliotis midae* (Booolootian *et al.*, 1962; Newman, 1967). The biggest specimen size reported for wild *Haliotis tuberculata coccinea* populations was 70 mm in shell length (Nuñez *et. al.*, 1994), smaller than the size observed in our study (75 mm in shell length). The size of this species is similar to the size of other warm-water species such as *Haliotis diversicolor supertexta*. However, other species of culture interest such as *Haliotis tuberculata tuberculata*, *Haliotis discus hannai* and *Haliotis rufescens* reach higher sizes of 120, 200 and 275 mm in shell length, respectively (Hanh, 1989). Accordingly, the different maximum shell lengths observed in abalone species suggest variations in the growth parameters. The results obtained in this study showed similar values of  $k$  (0.37-0.43 / year) and lower value of  $L_{\infty}$  (72.50-78.8 mm in shell length) than *Haliotis tuberculata tuberculata* ( $k= 0.25-0.45$  / year and  $L_{\infty}= 99-119$  mm in shell length; Day and Fleming, 1992). We consider that, in cold waters, the short spawning periods favour the energy supplies for growing up, whereas, in warm water where spawning periods are longer, most energy is used for reproductive purposes.

The knowledge gained with this study may be useful in *Haliotis tuberculata hatcheries*. The ability to have mature individuals throughout the year or at predictable times will allow aquaculturist to schedule hatchery processes during periods that are more favourable for growth and survival (Hanh, 1989). Therefore, the culture of this species requires the conditioning broodstock from the late summer until early winter, when population showed a higher maturity rate. Hence, the gonadal maturation of some warm-water abalone species respond to temperature changes (Leighton *et al.*, 1981; Morse, 1984; Hooker and Morse, 1985). It would be interesting to study the conditioning of *Haliotis tuberculata coccinea* broodstock from late winter until spring by raising them in seawater at a temperature between 18°C and 22°C. Furthermore, the significantly higher fecundity rates found in individuals larger than 55 mm in shell length suggest that, to optimize egg production, this is the minimum broodstock size that should be used in commercial hatcheries.

## 4.2. Experimento II

### Alimentación durante el Acondicionamiento



Este experimento ha sido enviado para su revisión en 2011 por Bilbao, A., I. Uriarte, M.P. Viera, B. Sosa, H. Fernández-Palacios, y C.M. Hernández-Cruz con el título de "Effect of Macroalgae Protein on Some Reproductive Aspects and Physiological Parameters for the Abalone *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846) a la revista Journal of the World Aquaculture Society.



## 4.2.1. INTRODUCTION

The abalone present in the Canary Islands is *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve (1846). It is a small subtropical species with a maximum shell length of 8 cm and its spawning season occurs all over the year (Bilbao *et al.*, 2010a) as well as other tropical species (e.g. *Haliotis asinina* and *Haliotis diversicolor*) (Takashima, 1978; Capinpin *et al.*, 1998). The Government of the Canary Islands has recently declared *Haliotis tuberculata coccinea* as a new species for the diversification of local commercial aquaculture. However, its culture should be developed from broodstock kept in captivity and separated from natural populations, since *Haliotis tuberculata coccinea* is legally protected and its capture is prohibited in the natural environment (cf. Official Gazette of the Canary Islands BOC-2001/097).

The broodstock conditioning is mainly based on a proper diet in order to reach an optimal development of the gonad. Thus, it is essential to know the nutritional requirements of the species to be conditioned. Although the nutritional studies carried out on broodstock abalone are scarce, it is known that the amount of proteins in the diet plays an important role in gonadal morphology and the fecundity. Jackson *et al.* (2001) reported that the amount of macrophages in *Haliotis asinina* mature gonads increases as a result of stress or malnutrition of animals fed on artificial diets with both low protein content and relative high lipid content. Likewise, Bautista-Teruel *et al.* (2001) observed that, to some extent, *Haliotis asinina* fecundity increased due to the higher amount of proteins supplied in the diet. Specific lipids such as polyunsaturated fatty acids (PUFA) (e.g. Arachidonic acid, AA, 20:4n-6 and Eicosapentaenoic, EPA, 20:5n-3) play an important role in the gonadal development of abalone (Nelson *et al.*, 2002). It is also known that feeding *Haliotis laevis* on an altered diet over a 3-month period is sufficient to alter the PUFA profile of the eggs (Daume and Ryan, 2004) and Graham *et al.* (2006) suggested that depending on spawning frequency, broodstock diet can influence the cytoplasm diameter and jelly coat thickness.

Feeding abalone with seaweeds of the genera *Gracilaria* is appropriate in terms of growth and survival rates (Reyes and Fermin, 2003; Naidoo *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2010). Furthermore, species such as *Gracilaria flagelliformis* have a high content of arachidonic acid, playing an essential role in the mollusk reproduction (Daume and Ryan, 2004). The species *Gracilaria cornea* is found in the Canary Islands and it is a good feed for *Haliotis tuberculata coccinea* when it is fertilized in an effluent from fish cultures (Viera *et al.*, 2005). Since the genera of *Gracilaria* captures the nutrients present in the water, with one of the highest nutrient intake capacity known, the seaweed protein content can be manipulated under specific culture

conditions (Neori *et al.*, 2004). This is interesting for two reasons; firstly, because *Gracilaria cornea* becomes an ideal species for an experimental study on the effects of the nutritional value of macroalgae on abalone reproduction. And secondly, because it provides a commercial approach, since wild algae are not commercially valuable in the Canary Islands and, therefore, they are not harvested. Thus, the availability of this natural resource is scarce and insufficient to sustain the commercial production of abalone. Hence, the culture of seaweed for feeding broodstock is an alternative to wild food.

This study aims to understand the effect of protein content variations of the macroalga *Gracilaria cornea* fertilized by pulses on feeding *Haliotis tuberculata coccinea* and to improve our understanding about the nutritional requirements in broodstock conditioning. The experiment specifically compares the influence of the protein content variation of *Gracilaria cornea* on the growth, the consumption, the viability of spawning and both the fatty acid composition and the morphology of the gonad in *Haliotis tuberculata coccinea*.

## 4.2.2. MATERIALS AND METHODS

### Experimental diets

The macroalga used in this study was *Gracilaria cornea* (Agardh, 1852). Six circular white plastic tanks with a capacity of 90 l were used for the cultivation of macroalgae. An initial stock of 1000 g of seaweed was added in each tank. The tanks were located in a greenhouse, where maximum irradiance was close to 1600  $\mu\text{mol photons} / \text{m}^2$  per second. The water exchange rate was 4 volumes per day and aeration was supplied by a bottom-central linear pipeline.

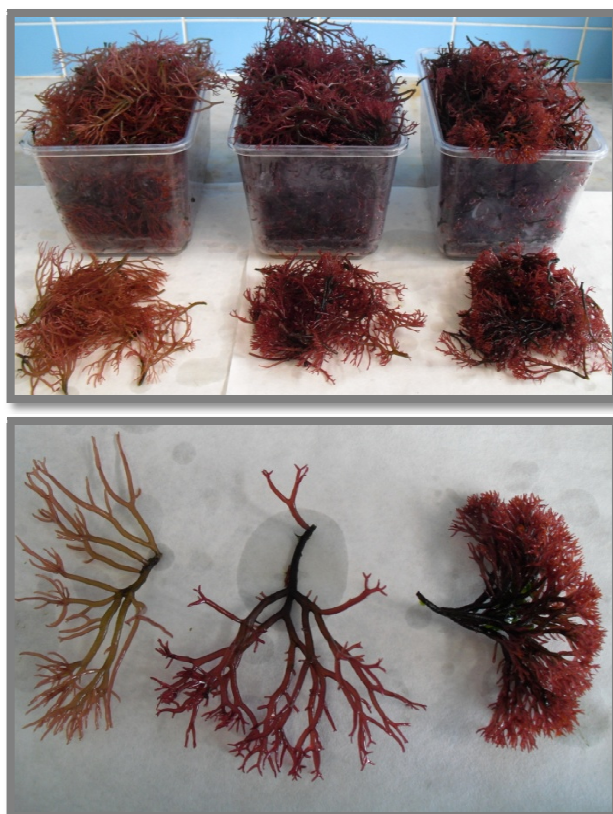
To produce *Gracilaria cornea* with different protein contents, 33.3 mg / l day (High-N), 11.1 mg / l day (Medium-N) and 1.1 mg / l day (Low-N)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  was supplied to two culture tanks per protein treatment for a minimum of 15 days, to ensure stable protein content. 3.3, 1.1 and 0.1 mg / l day  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  was then added to each culture, respectively. These nutrients were added by pulse-fertilizing three times a week for 6 to 8 hours. Every other week, the macroalgae were removed from the tanks and the excess water was removed by blotting them, afterwards, the macroalgae were wet weighed to assess algal biomass and restocked at the original density. The excess macroalgae were harvested for use in the experiment. The epiphytes were regularly removed from the plants.

### Experimental animals and culturing condition

Abalones (*Haliotis tuberculata coccinea*) were produced within the experimental hatchery production unit of ICCM. A total of 90 females aged 3 years (10 abalones / replicate)

with an average shell length and weight of  $46.79 \pm 2.30$  mm and  $15.38 \pm 2.61$  g, respectively, were selected for the trial. Females were acclimatized to the diets and new cultured conditions for 3 weeks and were induced to spawn.

Three diet types were tested: high protein content *Gracilaria cornea* (High-N *G. cornea*), medium protein content *Gracilaria cornea* (Medium-N *G. cornea*) and low protein content *Gracilaria cornea* (Low-N *G. cornea*) (Figure 26). Animals were weighed to the nearest 0.1 mg in body weight and 0.1 mm in shell length and assigned to an experimental unit (9 plastic tanks of 60 l). Abalones were distributed among replicates so that there were no significant differences in shell length and body weight. Each tank had a perforated basket in suspended that allowed separating the animals and the feces. Likewise, two shelters were placed in each tank. Filtered sea water ( $50 \mu\text{m}$ ) was provided with constant aeration. Water flowed through the tanks at a rate of 5 volumes per day. Abalones were subjected to a natural photoperiod of approximately 12 hours light / 12 hours dark.



**Figure 26** Three diet types: low protein content (in the left), medium protein content (in the middle) and high protein content *Gracilaria cornea* (in the right).

The experiment was carried out between November 2008 and August 2009. The experimental tanks were cleaned and fecal material removed once per week. Same day, the uneaten macroalgae were removed and replaced with fresh algae.

### **Growth and algal consumption**

To determine diet intake (D), the collected algae to be the fed to the abalone and the remaining algae in the tanks were weighted ( $\pm 0.01$  g) at the end of the week. Prior to weighing of algae the excess water was removed by blotting them with tissue paper. The weight of unconsumed food was deducted from the total weekly ration and is expressed in grams.

The following nutritional rates were calculated for all treatments at the end of the trial:

$$\text{Daily increase in shell length (DISL)} = (L_t - L_0) / t$$

$$\text{Specific growth rate for weight (SGR)} = 100 * (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

$$\text{Weight gain (WG)} = 100 * (W_t - W_0) / W_0$$

$$\text{Mean of total feed intake (MTFI)} = D / N$$

$$\text{Feeding rate (FR)} = 100 * D / [t * N * (W_t + W_0) / 2]$$

$$\text{Protein efficiency ratio (PER)} = (W_t - W_0) * N / \text{protein intake}$$

Where  $W_0$ : mean initial body weight (g),  $W_t$ : mean final body weight (g),  $L_0$ : mean initial shell length (mm),  $L_t$ : mean final shell length (mm), N: number of abalone in each cultivation tank, t: experimental duration (days), D: diet intake (g), protein intake (g).

### **Reproductive performance**

The spawning acts in *Haliotis tuberculata coccinea* are related to spring tides around new or full moons throughout the year in natural populations (Bilbao *et al.*, 2010a). Under culture conditions, sometimes some of conditioned-animals spontaneously spawn around the new or full moons, however these gametes are not viable in the activities of an abalone hatchery because they are unpredictable. Thus, we take into consideration the viability of spawning defined as the number of eggs released per gram of abalone after the spawning induction. Females were induced to spawn on March and September 2009. Females from each replicate were placed in 9 plastic tanks and spawning was conducted using a flow-through system of UV irradiated seawater over 3 days around the full moon. The spawned eggs were immediately separated from the animals with a siphon and were concentrated into a known volume of clean seawater. The water containing the eggs was gently stirred to ensure a homogenous distribution of eggs through water column, and three subsamples were taken for estimating the

amount of eggs released. The viability of spawning was considered as the total number of eggs released and it was divided by the weight of females that responded to spawning induction. We also measured the maximum diameter and the maximum diameter of the cytoplasm in 50 eggs using a profile projector (Mitutoyo PJ – 3000A, Kanagawa, Japan).

At the end of the experiment conical appendages of at least 2 mature females of each replicate were preserved in 10 % formaldehyde for histological study. The choice was based according to the visual gonad index proposed by Uki and Kikuchi (1984) and we only take into account the most mature females (2-advanced and 3 stages). The half part of conical appendage was carefully removed, and they were dehydrated, embedded in paraffin wax, sectioned in cross-sections (4 – 5  $\mu\text{m}$  thick) and stained with Harris' hematoxylin eosin. The slices were microscopically observed in order to assess the stage of maturity gonad according to the classification proposed by Capinpin *et al.* (1998) and we only take into account the ripe-stage gonads. Then, we evaluated the morphology of ripe-stage gonads.

### **Biochemical Analysis**

At the end of the experiment, we made dissection of gonad, digestive gland and muscle of abalones since these body components are likely sites of energy storage for subsequent use in gonad maturation. The samples collected were cleaned and frozen in -80 °C.

The biochemical analysis of each diet type was run during the conditioning period. The samples collected were cleaned, washed with freshwater to remove salts and epizoos, frozen in -80 C freezer and lyophilized at least 24 hours.

The biochemical analysis was carried out as following: The dry matter was determined by drying at 110 °C for 24 hours. Ash content was determined by incinerating samples at 600 °C for 24 hours. Total protein was calculated from total Kjeldahl nitrogen according to AOAC (2005) standard methods. Total lipids were extracted with chloroform-methanol (2:1) mixture as described by Folch *et al.* (1957). Fatty acids in the lipid extracts were transesterified to methyl esters (FAMEs) with 1% sulphuric acid: methanol complex (Christie, 1982). FAMEs samples were extracted into hexane and stored at -80 °C. Fatty acids were analyzed in a Thermo Finnigan-GC Focus gas chromatography equipped with a flame ionization detector (260 °C). FAMEs were separated with capillary column using helium as the carrier gas under the conditions described by Izquierdo *et al.* (1989).

## Statistical analysis

The results were submitted to a statistical analysis applying a 1-way ANOVA with diet as the fixed factor. Data was tested for normality prior to analysis using the Kolmogorov–Smirnov test. Bartlett's test was used to test for homogeneity of variances (Zar, 1996) and Tukey's multiple comparison test was used in pair-wise comparisons among diets when significant differences ( $P < 0.05$ ) were determined.

### 4.2.3. RESULTS

#### Algal nutritional composition

The nutritional compositions of the three *Gracilaria cornea* diets are showed in Table 2. The protein content exhibited statistical differences among three diet types: the highest value was observed in High-N *G. cornea* ( $29.88 \pm 2.38$  %), followed by Medium-N *G. cornea* ( $25.01 \pm 1.07$  %) and Low-N *G. cornea* ( $10.37 \pm 2.04$  %). There were also significant differences in the carbon content of the three diet types: the carbon content of Low-N *G. cornea* exhibited a 50 % higher value than observed in High-N *G. cornea*. The total lipid content did not vary among the diets. The ash content varied inversely to carbohydrate content: the lowest value was observed in Low-N *G. cornea* and it was significantly lower than in the other diets.

**Table 2** Proximate composition and caloric content of High-N *G. cornea*, Medium-N *G. cornea* and Low-N *G. cornea* (g / 100 g DW) fed to abalone along the experimental trial

	Low-N <i>G. cornea</i>	Medium-N <i>G. cornea</i>	High-N <i>G. cornea</i>
Moisture	$7.11 \pm 0.36$	$7.07 \pm 0.55$	$6.96 \pm 0.13$
Total protein	$10.37 \pm 2.04^c$	$25.01 \pm 1.07^b$	$29.88 \pm 2.38^a$
Total lipid	$1.99 \pm 0.15$	$2.22 \pm 0.14$	$2.08 \pm 0.13$
Carbohydrate*	$44.61 \pm 1.80^a$	$28.26 \pm 0.45^b$	$22.18 \pm 2.29^c$
Ash	$43.02 \pm 0.65^b$	$44.49 \pm 1.06^a$	$45.84 \pm 0.19^a$
GE <sup>§</sup> (Kcal/g)	$2.60 \pm 0.06$	$2.77 \pm 0.05$	$2.78 \pm 0.03$

Values in the same row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )  $N = 6 \times 2$ .

\* Calculated by difference (AOAC, 2005).

§ Gross energy was calculated based on the physiological values at 5.6 Kcal/g protein, 9.5 Kcal/g lipid and 4.1 Kcal/g carbohydrates (Cho *et al.*, 1982).

## Survival and growth performance

The survival rate was  $90.0 \pm 10.0$ ,  $83.3 \pm 15.3$  and  $83.3 \pm 15.3$  % in the Low-N, Medium-N and High-N treatments respectively. Hence, final shell length was significantly highest in animals fed on Medium-N *G. cornea* and High-N *G. cornea* and lowest in those fed on Low-N *G. cornea*. Accordingly, DISL followed the same pattern, this parameter being highest in animals fed on Medium-N *G. cornea* and High-N *G. cornea* and lowest in those fed on Low-N *G. cornea* (Table 3). However, the final body weight of abalones fed on High-N *G. cornea* was similar than those fed on Medium-N *G. cornea* and higher than those fed on Low-N *G. cornea*. In this way, SGR and WG followed this same pattern (Table 4).

**Table 3** Mean shell length (SL) and daily increase in shell length (DISL) in *Haliotis tuberculata coccinea* fed on Low-N *G. cornea* (Low-N), Medium-N *G. cornea* (Medium-N) and High-N *G. cornea* (High-N) during 296 days under laboratory conditions

Diet treatment	Mean initial SL (mm)	Mean final SL (mm)	DISL (mm/d)
Low-N	$46.45 \pm 2.44$	$54.17 \pm 2.33^b$	$0.026 \pm 0.004^b$
Medium-N	$46.90 \pm 2.08$	$56.29 \pm 3.43^a$	$0.032 \pm 0.007^a$
High-N	$47.00 \pm 2.41$	$57.73 \pm 3.01^a$	$0.036 \pm 0.007^a$

Values represent the mean of replicates. Values in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )  $N = 10 \times 3$ .

**Table 4** Mean body weight (BW), specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) in *Haliotis tuberculata coccinea* fed on Low-N *G. cornea* (Low-N), Medium-N *G. cornea* (Medium-N) and High-N *G. cornea* (High-N) during 296 days under laboratory conditions

Diet treatment	Mean initial BW (g)	Mean final BW (g)	SGR (% /day)	WG (%)
Low-N	$15.28 \pm 2.91$	$22.03 \pm 2.95^b$	$0.126 \pm 0.053^b$	$47.13 \pm 26.75^b$
Medium-N	$15.31 \pm 2.51$	$24.39 \pm 4.52^{ab}$	$0.156 \pm 0.046^{ab}$	$60.21 \pm 21.29^{ab}$
High-N	$15.54 \pm 2.51$	$25.15 \pm 4.25^a$	$0.162 \pm 0.045^a$	$63.19 \pm 22.97^a$

Values represent the mean of replicates. Values in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )  $N = 10 \times 3$ .

## The utilization of feeding

The feed utilization of *Haliotis tuberculata coccinea* is showed in Table 5. MTFI showed statistical differences among treatments. The highest value was observed in the High-N treatment and it was similar than those in the Medium-N treatment and higher than the value observed in the Low-N treatment. Although, FR of abalones fed on High-N *G. cornea* exhibited the highest value, we did not observe any statistical differences among treatments. On the contrary, PER was significantly higher in abalones fed on Low-N *G. cornea* than those fed on Medium-N and High-N *G. cornea*.

**Table 5** Feeding rate (FR) (% body weight/day), mean of total feed intake (MTFI) (g/individual) and protein efficiency ratio (PER) of *Haliotis tuberculata coccinea* fed on Low-N *G. cornea* (Low-N), Medium-N *G. cornea* (Medium-N) and High-N *G. cornea* (High-N) during 296 days under laboratory conditions

Diet treatment	FR (% body weight/day)	MTFI (g/ individual)	PER
Low-N	9.64 ± 1.31	479.58 ± 39.07 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.35 <sup>a</sup>
Medium-N	10.50 ± 0.84	542.59 ± 35.28 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.20 <sup>b</sup>
High-N	12.34 ± 2.18	653.54 ± 106.88 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.09 <sup>b</sup>

Values represent the mean of replicates. Values in the same column with different letters are significantly different (P<0.05) N= 10 x 3.

## The proximate composition of abalone

The proximate composition of abalones fed on Low-N, Medium-N and High-N *G. cornea* is showed in Table 6. The protein content of abalone viscera fed on High-N *G. cornea* was significantly higher than observed in the others treatments. The carbohydrate content of viscera varied inversely to protein content of the diet and the ash content did not show statistical differences among the three treatments. The lipid content of viscera did not show a clear relation to protein content of diets.

The abalone muscle was the most affected organ to relation the protein content of the diets. The protein content of the muscle exhibited a positive relation to protein content of the diet. The highest value was observed in the animal muscle fed on High-N *G. cornea* followed by those fed on Medium-N and Low-N *G. cornea*. On the contrary, the carbohydrate content of the



muscle exhibited an inverse relation to protein content of the diets. The lipid and ash contents did not show a clear tendency to protein content of the diets.

**Table 6** The proximate composition of animals (viscera, muscle and gonad) fed on High-N *G. cornea* (High-N), Medium-N *G. cornea* (Medium-N) and Low-N *G. cornea* (Low-N) (g /100 g dried weighth)

Diet treatment	Moisture	Total protein	Total lipid	Carbohydrate*	Ash
<b>Viscera</b>					
Low-N	72.68 ± 1.94	50.97 ± 0.52 <sup>b</sup>	14.66 ± 2.01 <sup>ab</sup>	25.15 ± 2.26 <sup>a</sup>	09.22 ± 1.49
Medium-N	75.08 ± 0.69	51.11 ± 1.01 <sup>b</sup>	16.37 ± 0.93 <sup>a</sup>	22.91 ± 1.72 <sup>a</sup>	09.60 ± 0.84
High-N	73.81 ± 1.06	60.97 ± 3.63 <sup>a</sup>	12.61 ± 0.38 <sup>b</sup>	16.68 ± 4.29 <sup>b</sup>	10.30 ± 0.76
<b>Muscle</b>					
Low-N	73.87 ± 2.60	58.77 ± 2.81 <sup>c</sup>	4.69 ± 0.44 <sup>a</sup>	29.36 ± 1.06 <sup>a</sup>	7.73 ± 1.28 <sup>ab</sup>
Medium-N	73.99 ± 1.94	66.99 ± 4.56 <sup>b</sup>	3.92 ± 0.91 <sup>ab</sup>	22.52 ± 3.85 <sup>a</sup>	6.56 ± 0.71 <sup>b</sup>
High-N	72.92 ± 0.81	74.84 ± 2.39 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.10 <sup>b</sup>	12.93 ± 2.49 <sup>b</sup>	8.88 ± 0.33 <sup>a</sup>
<b>Gonad</b>					
Low-N	66.21 ± 4.32	55.76 ± 4.98	32.42 ± 3.31	11.83 ± 0.73	4.71 ± 0.77
Medium-N	69.12 ± 5.04	56.20 ± 2.60	29.59 ± 0.48	11.07 ± 1.13	4.68 ± 1.58
High-N	63.35 ± 1.34	55.13 ± 1.57	33.46 ± 3.67	11.23 ± 1.56	3.98 ± 0.07

Values represent the mean of replicates. Values in the same column with the same letters are not significantly different (P<0.05) N=8 x 3.

\* Calculated by difference (AOAC, 2005).

The contents of lipid, protein, ash and carbohydrate of abalone gonads did not show significant differences among the three treatments. The protein was the principal component of gonad, followed by lipid, carbohydrate and ash.

### Fatty acid composition of diets and gonads

High-N *G. cornea*, Medium-N *G. cornea* and Low-N *G. cornea* had a similar composition of fatty acid (FA) (Table 7). Palmitic acid (16:0) was the major FA, followed by Arachidonic acid [AA 20:4(n-6)].

The FA composition of gonads is showed in the Table 8. Palmitic acid (16:0) was the major FA. The second most abundant FAs were Vaccenic acid [18:1 (n-7)], Arachidonic acid [AA, 20:4(n-6)], Oleic acid [18:1 (n-9)] and Myristic acid (14:0).

**Table 7** Fatty acid composition of the three diets

<b>FAMES</b>	<b>Low-N</b> <i>G. cornea</i>	<b>Medium-N</b> <i>G. cornea</i>	<b>High-N</b> <i>G. cornea</i>
14:00	5.57 ± 0.17	4.45 ± 0.30	4.24 ± 0.23
14:1n-7	0.26 ± 0.27	0.25 ± 0.31	0.46 ± 0.25
14:1n-5	0.13 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01
15:00	1.42 ± 1.02	1.90 ± 0.80	2.47 ± 1.36
15:1n-5	0.34 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.02
16:0ISO	0.64 ± 0.07	0.63 ± 0.03	0.61 ± 0.04
16:00	47.03 ± 2.57	42.57 ± 1.71	43.78 ± 1.65
16:1n-7	1.53 ± 1.28	2.26 ± 0.10	2.19 ± 0.14
16:1n-5	0.35 ± 0.16	0.28*	0.25 ± 0.04
16:2n-4	0.01*	0.05 ± 0.06	0.09*
16:4n-3	1.12 ± 1.34	1.15 ± 0.41	0.16 ± 0.65
18:00	1.79 ± 0.49	2.01 ± 0.73	2.25 ± 0.62
18:1n-9	8.05 ± 0.48	7.93 ± 0.79	6.37 ± 0.73
18:1n-7	1.93 ± 0.30	1.23 ± 0.37	1.49 ± 0.36
18:2n-6	1.57 ± 0.80	2.76 ± 1.48	2.49 ± 0.99
18:2n-4	0.02*	0.01*	0.01
18:3n-6	0.31 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.45 ± 0.02
18:3n-4	0.03*	0.02*	0.03*
18:3n-3	0.11 ± 0.07	0.12 ± 0.12	0.03 ± 0.84
18:4n-3	0.02*	0.01*	0.01*
18:4n-1	0.71 ± 0.82	0.39 ± 0.38	0.12 ± 0.45
20:1n-9+n-7	0.18 ± 0.09	0.09*	0.08 ± 0.05
20:1n-5	0.04 ± 0.05	0.06*	0.06 ± 0.07
20:2n-6	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.00	0.15 ± 0.06
20:3n-6	2.47 ± 0.33	2.56 ± 0.52	2.19 ± 0.32
20:4n-6	22.08 ± 2.82	25.73 ± 3.15	27.35 ± 2.50
20:3n-3	---	---	0.03*
20:4n-3	0.02*	0.02 ± 0.02	---
20:5n-3	0.68 ± 0.62	0.88 ± 0.95	0.61 ± 0.47
22:1n-11	0.04*	0.10 ± 0.09	0.16
22:1n-9	0.09*	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.01
22:5n-6	0.02*	0.03 ± 0.04	0.06 ± 0.01
22:5n-3	0.13 ± 0.10	0.11 ± 0.10	0.04 ± 0.06
22:6n-3	1.17 ± 1.13	1.59 ± 1.74	1.82 ± 1.63
Saturated	54.39	49.04	50.27
Unsaturated	45.73	51.20	50.14
n-3 PUFA	3.26	3.53	2.70
n-6 PUFA	26.67	33.06	32.69
n-3 HUFA	2	2.60	2.50
n-6 HUFA	24.80	28.54	29.75

Total fatty acid methyl esters (FAMES) (mg/g of tissue). Values represent the mean of replicates (N= 3 x 2). \*Only it was detected for one replicate.

**Table 8** Fatty acid composition of gonad tissue *Haliotis tuberculata coccinea* fed on the three treatments: Low-N *G. cornea* (Low-N); Medium-N *G. cornea* (Medium-N) and High-N *G. cornea* (High-N)

FAMES	Gonad Low-N	Gonad Medium-N	Gonad High-N
14:00	7.27 ± 0.15	7.28 ± 0.12	7.18 ± 0.13
14:1	0.03 ± 0.01	0.04	0.06 ± 0.01
15:00	0.57 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.61 ± 0.03
16:0ISO	0.01	0.02	0.04
16:00	36.88 ± 1.27	34.92 ± 0.71	34.72 ± 2.22
16:1	5.07 ± 0.37	4.53 ± 0.52	5.26 ± 0.49
16:2n-6	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.37
17:00	0.49 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.62 ± 0.01
16:3	0.24	0.32 ± 0.02	0.48 ± 0.01
16:4n-3	1.56 ± 0.07	1.81 ± 0.08	1.81 ± 0.03
18:00	2.37 ± 0.13	2.48 ± 0.30	2.19 ± 0.09
18:1n-9	6.85 ± 0.33	7.41 ± 0.32	6.95 ± 0.56
18:1n-7	19.62 ± 1.12	18.28 ± 1.11	18.59 ± 1.23
18:1n-5	1.10 ± 0.47	1.13 ± 0.59	0.62 ± 0.10
18:2	0.26 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.07
18:3	0.28 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.58 ± 0.04
18:4n-3	0.02	0.01	0.03 ± 0.01
20:00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
20:1n-9+n-7	4.48 ± 0.31	4.99 ± 0.39	4.43 ± 0.44
20:1n-5	0.59 ± 0.04	0.62 ± 0.06	0.57 ± 0.08
20:2n-9	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03
20:2n-6	0.30 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.28 ± 0.03
20:3n-6	0.32 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.43 ± 0.05
20:4n-6	6.57 ± 0.15	7.65 ± 0.65	8.35 ± 0.24
20:3n-3	0.09*	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
20:4n-3	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01
20:5n-3	1.35 ± 0.19	1.37 ± 0.15	1.24 ± 0.28
22:1	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.27 ± 0.07
22:4n-6	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05
22:5n-6	2.57 ± 0.15	3.03 ± 0.15	3.17 ± 0.38
22:5n-3	0.13 ± 0.13	--	--
22:6n-3	0.51*	0.42 ± 0.09	0.25 ± 0.21
Saturated	47.65	45.86	45.40
Unsaturated	52.76	54.14	54.60
n-3 PUFA	4.06	4.32	4.33
n-6 PUFA	10.20	12.01	12.82
n-3 HUFA	2.09	1.91	1.69
n-6 HUFA	9.82	11.58	12.28

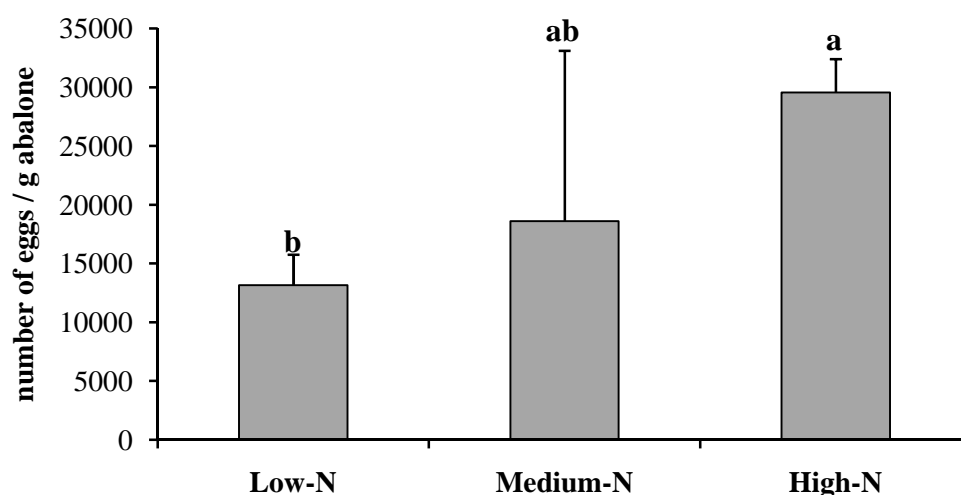
Total fatty acid methyl esters (FAMES) (mg/g of tissue). Values represent the mean of replicates (N= 8 x 3). \*Only it was detected for one replicate.

Eicosapentaenoic acid [EPA, 20:5(n-3)] and Docosahexaenoic acid [DHA, 22:6(n-3)] were present in all diet treatments gonad. By increasing the protein content in the diet, saturated fatty acids in the gonad were decreased in the same proportion that of unsaturated fatty acids were increased (2 %). The n-6 PUFA (polyunsaturated fatty acids) exhibited a positive relation to protein content of the diets (10.20 to 12.82 %): including n-6 HUFA (polyunsaturated fatty acids with 20 or more carbon atoms) (9.82 to 12.28 %) and AA (6.57 to 8.35 %). However, the amounts of n-3 PUFA and n- 3 HUFA were unchanged to protein content of the diets (including EPA and DHA).

### The viability of spawning and egg morphology

In the all experimental tanks, we observed some spawning acts spontaneously along the period of study.

The viability of spawning is showed in the Figure 27. The highest amount of eggs per gram abalone was observed in females fed on High-N *G. cornea* (29,564 ± 2,845 eggs/g) followed by Medium-N and Low-N treatments (18,600 ± 14,523 and 13,160 ± 2,589 eggs/g respectively).



**Figure 27** The viability of spawning of *Haliotis tuberculata coccinea* females fed on Low-N *G. cornea* (Low-N) (N=10), Medium-N *G. cornea* (Medium-N) (N=16) and High-N *G. cornea* (High-N) (N=15) after two spawning inductions along the experimental trial. Vertical bars indicate standard error of means. Values with different letters are significantly different (P<0.05).

In the first and second inductions of spawning, the maximum diameter of abalone eggs fed on Low-N *G. cornea* was significant lower (P<0.05) than the values observed in the other treatments (Table 9). A similar trend (P<0.05) was observed in the cytoplasm diameter (Table 9).

**Table 9** Maximum diameter of egg and maximum diameter of the egg cytoplasm for *Haliotis tuberculata coccinea* fed on the three diets: Low-N *G. cornea* (Low-N), Medium-N *G. cornea* (Medium-N) and High-N *G. cornea* (High-N). The values correspond to two inductions of spawning

Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Low-N	Medium-N	High-N
egg (1 <sup>st</sup> spawning)	195.31 $\pm$ 9.46 <sup>b</sup>	200.13 $\pm$ 11.17 <sup>a</sup>	201.68 $\pm$ 11.33 <sup>a</sup>
egg (2 <sup>sd</sup> spawning)	197.12 $\pm$ 7.51 <sup>b</sup>	201.68 $\pm$ 08.37 <sup>a</sup>	202.90 $\pm$ 08.27 <sup>a</sup>
cytoplasm (1 <sup>st</sup> spawning)	152.78 $\pm$ 6.77 <sup>b</sup>	156.82 $\pm$ 07.31 <sup>a</sup>	158.49 $\pm$ 05.56 <sup>a</sup>
cytoplasm (2 <sup>sd</sup> spawning)	150.82 $\pm$ 7.69 <sup>b</sup>	155.27 $\pm$ 08.92 <sup>a</sup>	157.42 $\pm$ 05.45 <sup>a</sup>

Values in the same row with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) (N= 50).

### Ovary morphology

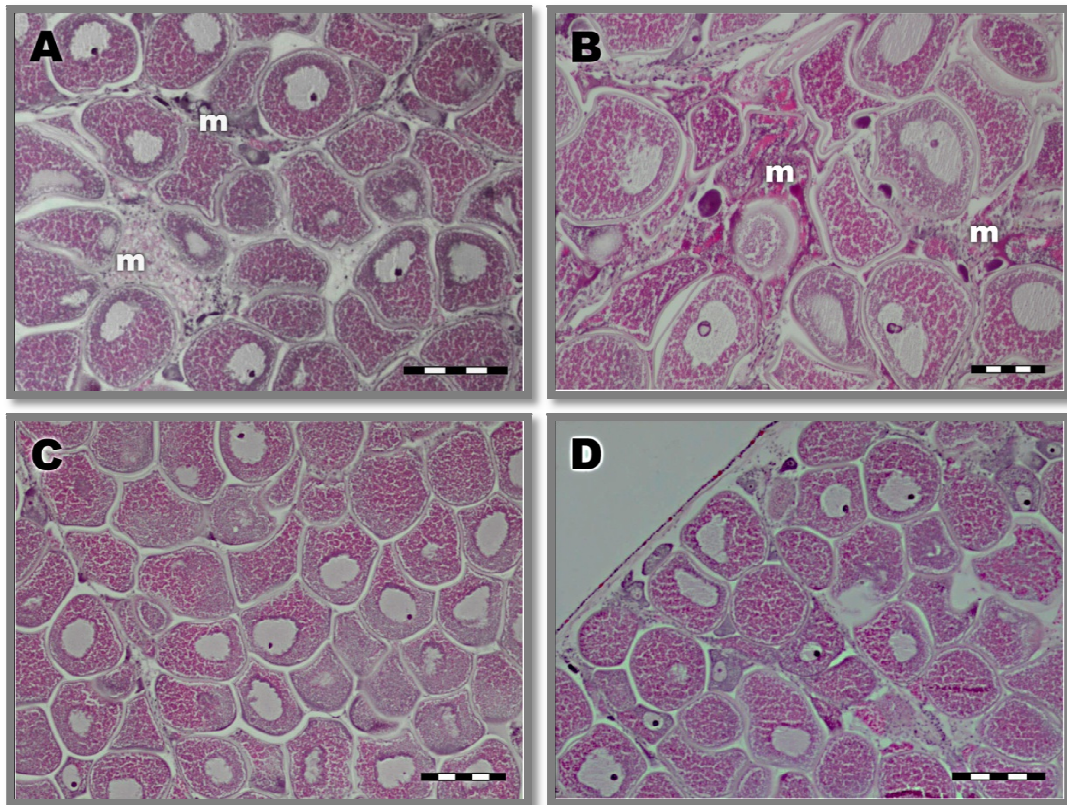
Sections of ripe-stage gonads from animals reared on diet Low-N *G. cornea* showed more amount of macrophages populations and as a result larger areas of degenerated oocytes than animals reared on diets Medium-N *G. cornea* and High-N *G. cornea* (Figure 28).

#### 4.2.4. DISCUSSION

Since seaweed easily catches the nutrients present in the water and has the ability to maintain the protein content in its tissues, recent studies have focused on increasing the protein content of natural diets in order to improve the growth of marine invertebrates (Neori *et al.*, 1998; Farías and Uriarte, 2001; Demetropoulos and Langdon, 2004; Viera *et al.*, 2005; Cook and Kelly, 2007). Using the method described above, the Medium-N and High-N *G. cornea* composition compares well to optimal dietary values reported by Mercer *et al.* (1993) who suggested formulated abalone diets be composed of >15% protein, 20–30% carbohydrate, and 3–5% lipid and results of Mai *et al.* (1995a) who found the optimum dietary protein content for *Haliotis tuberculata* was between 24 and 34 %. In fact, a better growth rate in WG, SGR and DISL terms was observed in the female broodstock on these treatments.

Although the individuals were fed with a single-species algae diet, the growth observed (DSIL and SGR) was in the range obtained by Neori *et al.* (1998) in adult *Haliotis tuberculata* individuals fed on *Ulva lactuca* and *Gracilaria conferta* enriched in an ammonium-rich effluent (0.02 – 0.07 mm/day and 0.25 – 0.26 %/day) and also similar to the results obtained in other studies on similar-age abalone fed on natural diets (0.026 – 0.045 mm/day and 0.14 – 0.27 %/day: Nelson *et al.*, 2002; Alcantara and Noro, 2006; Francis *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2010).

However, the growth was much lower than the growth observed by Viera *et al.* (2005) (about 10 times in WG and SGR rates) in juvenile *Haliotis tuberculata coccinea* individuals fed on enriched *Gracilaria cornea*. This fact shows that juveniles have a higher specific growth than adult individuals in terms of both the body weight and shell length, as observed by Laass and Vosloo (2010) in *Haliotis midae*.



**Figure 28** Representative ripe-stage ovary structures of *Haliotis tuberculata coccinea* fed on Low-N *G. cornea*, Medium-N *G. cornea* and High-N *G. cornea*. A-B: Sections of ripe-stage ovary taken from females fed on Low-N *G. cornea* during 296 days. Note the lack of over-all integrity of the gonad in A, with large populations of macrophages (m). In B, some oocytes that have had their vitelline envelope ruptured are undergoing phagocytosis by macrophages. C-D: Section of ripe-stage ovary taken from females fed on Medium-N *G. cornea* and High-N *G. cornea* (C and D respectively). Normal ripe-stage ovaries with the presence of polygonal shape mature oocytes. Scale bars in A, C and D are 200  $\mu\text{m}$  and in B is 100  $\mu\text{m}$ .

During the present study, the High-N treatment showed a higher ( $P < 0.05$ ) diet intake (MTFI) than the Low-N treatment. Such difference disappeared when the growth of animals was considered (as reported in FR values). However, the FR did not show statistical differences among the three treatments. Previous studies have found a negative relationship between the ingestion rate and the protein content when abalones were fed on different macroalgae species

(Hanh, 1989; Qi *et al.*, 2010). On the contrary, this relationship was not supported for *Haliotis tuberculata coccinea* during this trial. Other authors also found a similar relationship for *Haliotis asinina* and *Haliotis laevigata* fed on artificial diets with different protein content, all of which were formulated with similar amino acid profiles (Jackson *et al.*, 2001; Coote *et al.*, 2000). It seems, therefore, that the dietary protein content is not the only factor controlling the ingestion rates in abalone species. Some studies showed that abalones apparently consume food to satisfy an energy requirement (Bautista-Teruel and Millamena, 1999; Gómez-Montes *et al.*, 2003). The dietary lipid requirement of abalone is believed to be low (Mai *et al.*, 1995b). Therefore, carbohydrates are probably the preferred source of energy (Knauer *et al.*, 1996; Monje and Viana, 1998). In the present study, the inverse relationship between the protein and carbohydrate content of the three dietary treatments resulted in a similar amount of gross energy in the Low-N, Medium-N and High-N *G. cornea*. Thus, *Haliotis tuberculata coccinea* seems to have been eating their fill until its energetic requirements were satisfied and, as a result, no FR differences were observed among the treatments. This suggests that the growth differences among the three feeding treatments may be due to nutritional factors (e.g. protein content) rather than to diet preferences (Vandepeer *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2001).

The PER values suggested that *Haliotis tuberculata coccinea* is unable to convert a high protein content of *Gracilaria cornea* diets (25 and 30 % crude protein) into tissue with the same efficiency as the 10 % protein *Gracilaria cornea* diet. This efficiency reduction has been also observed in *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai* species fed on macroalgae and on formulated diets respectively (Uki and Watanabe, 1992; Demetropoulos and Langdon, 2004). Thus, the growth observed in the Medium-N and High-N treatments was less efficient than in the Low-N treatment. It must be taken account that wild abalones are herbivores and are used to living and growing on relatively low protein-content diets. Mercer *et al.* (1993) assessed the nutritional value of eight algal diets for *Haliotis tuberculata* and reported that the best growth rate was found in the species *Palmaria palmata* with protein levels of 15.93 – 18.38 % dried weight.

In this trial, by increasing the amount of protein content in the diet, the protein contents in the muscle and viscera increased significantly. Mai *et al.* (1995a) found a similar pattern on the carcass composition of *Haliotis tuberculata*. Thus, this result, along with our finding, suggests that the additional protein content in the high protein diets fed to broodstock were mainly stored in the muscle and viscera of abalones.

The total lipid content in the muscle, viscera and gonad (3.3-4.7, 12.6-16.4 and 29.6-33.5 % respectively) of *Haliotis tuberculata coccinea* species fed on the three *Gracilaria cornea*

treatments were similar to the results previously reported on both wild and cultivated abalone fed on formulated diets and macroalgae (Floreto *et al.*, 1996; Chiou *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002; Litaay and DeSilva, 2003; Grubert *et al.*, 2004). With the exception of EPA, the amount of different fatty acid levels found in gonads was within the range obtained by Nelson *et al.* (2002) throughout one year in *Haliotis fulgens* adults fed on different macroalgae: palmitic acid (16:00) was the dominant saturated fatty acid and vaccenic acid (18:1n-7) was reported as the dominant monounsaturated fatty acid (35-37 and 18-20 % respectively). Likewise, the percentage of EPA, total n-3 and n-6 fatty acids in the gonads of *Haliotis tuberculata coccinea* were similar (1.4, 6 and 20-25 % respectively) to those obtained by Grubert *et al.* (2004) in mature gonad of *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata* species fed on a formulated diet (1.9, 4.4-6.2 and 23 % respectively). However, in the present study, the percentage of AA (6-8 %) was higher than the value obtained in *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata* (0.7 and 0.9, respectively). Daume and Ryan (2004) compared the eggs of abalones fed on formulated diets and macroalgae and proved that the PUFA composition of the broodstock diet influenced the PUFA profile of the eggs. It must be considered that, in the three studies (the present study; Nelson *et al.*, 2002; Grubert *et al.*, 2004), the diets fed to broodstock (formulated diet and diet based on different macroalgae species) had different fatty acid profiles and, thus, the differences of the PUFA composition of the *Haliotis rubra*, *Haliotis laevigata* and *Haliotis tuberculata coccinea* gonads may be due to the different PUFA profiles of the diets.

Regarding the gamete development and the broodstock nutrition of abalone species, significant attention has been paid long-chain PUFAs, such as AA, EPA and DHA, since abalones are unable to synthesis these PUFA de novo (Uki *et al.*, 1986; Mai *et al.*, 1996). Abalone require EPA in the diet rather than DHA (Uki *et al.*, 1986), and when the dietary EPA is low (e.g. < 1% total FA in this study) they are able to retroconvert DHA into the EPA form (Dunstan *et al.*, 1996). This may explain the amount of EPA observed in the gonads in comparison to those found in the three diets.

Although high levels of AA may not required for muscle growth, it may be required for ovogenesis and embryogenesis (Daume and Ryan, 2004). The AA is related to the cell transmission functions and is the precursor of the eicosanoids, particularly prostaglandins (Bell *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 2002; Bell and Sargent, 2003), which are involved in several reproductive processes (Moore, 1985; Nelson *et al.*, 2002; Laas and Vosloo, 2010), including the production of steroid hormones and the gonadal development such as ovulation. The lipid of the eggs is major parts of the energetic during early ontogeny and larval metamorphosis (Litaay *et al.*, 2001; Daume and Ryan, 2004). Moreover, Jensen *et al.* (1990) showed that the metamorphosis of *Haliotis rufescens* larvae was influenced by free fatty acids, especially AA. As



we discussed above, the gonad and the egg PUFA profile depends on the broodstock diet, especially the AA, considering that abalones are not able to synthesize AA from n-6 series with lower FAs (Floreto *et al.*, 1996). Considering that *Gracilaria cornea* had a high amount of AA, it is an appropriate food for abalone broodstock. Moreover, when the highest protein diets were used, the n - 6 PUFA and specifically the AA slightly increased (2 %) in the gonads. Cook *et al.* (2007) showed that a high protein content in the diet promotes the accumulation of AA in the tissue of the sea urchin gonad (*Psammechinus miliaris*) during maturation. However, this behavior has not been clearly observed in the present study because increasing the amount of protein in *Gracilaria cornea* also increased the amount of AA (from 22 to 27 %). Thus, the increase of the AA amount observed in the gonads of the three treatments may be due to a different amount of AA in the diet rather than to a protein supplement to the diet.

The relationship between the dietary protein content and the fecundity has been little considered in mollusk aquaculture. Farías and Uriarte (2001) showed that a protein supplement to a high-protein diet fed to scallop (*Argopecten purpuratus*) broodstock was mainly used for the production of a larger amount of eggs and not for the production of larger eggs. Likewise, Bautista-Teruel *et al.* (2001) suggested that a higher amount of macronutrients in the artificial diet used in their study, such as proteins and lipids, improved the reproductive performance of *Haliotis asinina* (i.e. fecundity and egg hatching rates). Although the real fecundity of *Haliotis tuberculata coccinea* has not been considered in the present study, as we did not count the spontaneous spawning, the results showed the highest values of the viability of spawning in females fed on Medium-N and High-N *G. cornea*.

The broodstock can respond to nutritional stress conditions by reabsorbing the mature gametes. Martinez *et al.* (1992) concluded that a reduction in the gonad index of a hatchery-reared scallop (*Argopecten purpuratus*) was caused by the reabsorption of mature gametes because the broodstock was under nutritional stress. Likewise, Jackson *et al.* (2001) showed that juvenile *Haliotis asinina* fed on two artificial diets (with low protein content and a relatively high amount of lipids) grew less and mature gonads contained a large amount of macrophage populations reabsorbing mature eggs as a result of malnutrition or stress in the animals. In the present study, the morphology of the ripe-stage gonads of abalones fed on Medium-N and High-N treatments were similar to those found in the ripe-stage gonads of wild *Haliotis tuberculata coccinea* (Bilbao *et al.*, 2010a). However, the ripe gonads of females fed on Low-N *G. cornea* showed a higher amount of macrophage populations. In fact, with the Low-N treatment, the eggs expelled after the spawning induction were significantly smaller than those found in the other two treatments. Graham *et al.* (2006) showed that the eggs spawned by *Haliotis laevigata* broodstock fed on different diets (red seaweed and formulated diets) had different

sizes, suggesting that the lack of some macronutrients or micronutrients in the diets affected the egg size. In the present study, the protein content was the major difference among the diets. Hence, we used a single macroalga species as food for the broodstock. It must be taken into account that the larger eggs are not necessarily obtained from the highest AA-content diets (Graham *et al.*, 2006). Thus, the large amount of macrophages in the ripe gonads receiving the Low-N treatment may result in a smaller size of the eggs expelled after the spawning induction, since the macrophages reabsorbed the most mature oocytes. This may be due to the malnutrition of the animals, which may arise from an insufficient protein content in the diet. Further research in this field with more appropriate experimental designs (i.e., increasing the sample size and increasing the frequency of gonad sampling) may provide a better understanding of the impact of the dietary protein content on the gonad morphology.

In conclusion, the use of *Gracilaria cornea* enriched with 33.3 mg/ l day  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  resulted in the highest growth rate, in an increase of the viability of spawning and in a higher AA content mature gonad. Thus, the methodology described in this study would be a simple and inexpensive method to obtain a better conditioning of broodstock abalone, especially in the Canary Islands, where there is not a stable market for harvesting seaweed and their geographical isolation makes the purchase of artificial feed more expensive.



## 4.3. Experimento III

### Eficacia del Aceite de Clavo como Anestésico



Este experimento fue publicado en 2010 por Bilbao, A., G. Courtois De Vicose, M. Viera, B. Sosa, H. Fernández-Palacios y M.C. Hernández con el título de "Efficiency of Clove Oil as Anesthetic for Abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve)" en el volumen 29 (3) de la revista Journal of Shellfish Research.

Este experimento fue presentado como poster en 2009 por Bilbao A., G. Courtois de Vicose, M.P. Viera M.P., B. Sosa, H. Fernández-Palacios y M.C. Hernández con el título de "Efficiency of Clove Oil as Anesthetic for Abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve)" en el congreso VII Internacional Abalone Symposium en Pattaya, Thailandia.

### 4.3.1. INTRODUCTION

In abalone aquaculture, there are many instances requiring some sedation to facilitate handling animals without injuring or stressing them excessively. Abalone is well adapted to hold tightly onto the substratum, and mechanical assistance is necessary to remove them. Dislodgement by mechanical means often results in injury or death because their slow healing rate, absence of a blood coagulation mechanism and stress (Armstrong *et al.*, 1971; Genade *et al.*, 1988). Chemical removal, by anaesthetizing the animals provides a safer alternative to mechanical removal (White *et al.*, 1996). On other hand, in pearl culture of abalone, animals require some degree of relaxation to facilitate nucleus implantation.

When choosing an anaesthetic, a number of considerations are important, such as efficacy, cost, availability and ease of use, as well as toxicity to animal, humans, and the environment (Soto and Burhanuddin, 1995). Aquilina and Roberts (2000) consider that the anaesthetic used for relaxation to allow for the insertion of pearl nuclei in abalone has to have the following characteristics: rapid onset of relaxation, full extension and softening of the muscles for at least 10 minutes, and rapid recovery. Several anaesthetics have been suggested for abalone aquaculture (Sagara and Ninomiya, 1970; Prince and Ford, 1985; McShane and Smith, 1988; Hanh, 1989; Tong *et al.*, 1992; White *et al.*, 1996; Aquilina and Roberts, 2000; Sharma *et al.*, 2003); however, most of them are chemical products such as magnesium sulphate, 2-phenoxyethanol, pentobarbitone, and benzocaine.

Cloves are the dried flower buds of *Eugenia caryophyllata*, and its active ingredient is eugenol. Aroma chemicals present in natural leaves and flowers have been widely used in aroma therapy since ancient times, suggesting that they have some beneficial health effects. Clove oil has been traditionally used by humans as an oral analgesic, and it has been investigated as sources of anti-microbial agents against oral bacteria (Cai and Wu, 1996), it has demonstrated its antifungal (Martini *et al.*, 1996) and antioxidant activity in human food comparable with  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) (Kwang-Geun and Shibamoto, 2001), and it is effectively used for asthma and various allergic disorders by oral administration (Kim *et al.*, 1998).

In aquaculture, clove oil is considered superior to a number of anaesthetics, such as benzocaine and MS-222 (Munday and Wilson, 1997; Keene *et al.*, 1998). Because clove oil is a natural product and is less expensive than other anaesthetics used in fish, it has received considerable attention (Endo *et al.*, 1972; Soto and Burhanuddin, 1995; Cho and Heath, 2000; Wagner *et al.*, 2002; Hoskonen and Pirhonen, 2004; Mylonas *et al.*, 2005). However, in mollusc

aquaculture, its anaesthetic effect has been demonstrated only in the common octopus, *Octopus minor* (Seol *et al.*, 2007) and in pearl oyster, *Pinctada albina* (Norton *et al.*, 1996).

The objective of the present study was to evaluate the use of clove oil as natural anaesthetic in *Haliotis tuberculata coccinea*, comparing its efficacy to the commonly used 2-phenoxyethanol.

#### 4.3.2. MATERIALS AND METHODS

The experiment was undertaken in July 2008, using adults of *Haliotis tuberculata coccinea* produced at the Instituto Canario de Ciencias Marinas, Gran Canaria Island, Spain. The anaesthetics chosen for evaluation were clove oil at 4 different concentrations and 2-phenoxyethanol at 2 ml / l (Table 10).

**Table 10** Details of the anaesthetic treatments tested as muscle relaxants for *Haliotis tuberculata coccinea*

Treatment	Supplier	Final concentration (ml / l)	Final pH
2-phenoxyethanol	Panreac (Spain)	2	8.1
Clove oil *	Guinama (Spain)	0.1	8.1
Clove oil *	Guinama (Spain)	0.3	8.1
Clove oil *	Guinama (Spain)	0.5	8.1
Clove oil *	Guinama (Spain)	0.7	8.1

\* Clove oil was mixed with ethanol absolute at 50%.

The trial was conducted in transparent plastic aquaria holding 2 l seawater equipped with a shelter. To aid dissolution, the clove oil dose was shaken at 50% in absolute ethanol, and 2-phenoxyethanol was dispensed directly. Thirty animals per treatment (3 per aquaria), between 42 and 80 mm in shell length, previously tagged, were firmly attached to the shelter. The temperature was maintained as natural (22.3 °C) and, PH was measured before and after adding the anesthetics. The animals were kept in the solution for 30 minutes.

The relaxation time was defined as the length of time between the introduction of the animals into the aquaria and releasing from the shelter (Figure 29). At the conclusion of

relaxation, animals were rinsed thoroughly in freshwater before being placed on their shells (dorsal side down) into flowing seawater at the same temperature. Recovery time was defined as the length of time between release and the animal righting itself (turning over) (Aquilina and Roberts, 2000). Qualitatively, the effect of each chemical as muscle relaxant was observed, indicating the muscle condition (soft or contracted) and exudation of mucus.

Mortality was observed the next week. After this period, the trial was replicated 3 times in the following weeks with the same groups of animals.



**Figure 29** An animal released from the shelter due to the clove oil effect.

To evaluate the best clove oil concentration, the results were submitted to a statistical analysis applying a 1-way analysis of variance followed by a Tukey test for multiple comparisons of means, at a 5% significance level ( $P < 0.05$ ). The dates were transformed to a logarithmic function (Zar, 1996). Then the best clove oil concentration was compared with the 2-phenoxyethanol result.

### **4.3.3. RESULTS**

The results showed that both 2-phenoxyethanol and clove oil effectively produced anaesthesia in *Haliotis tuberculata coccinea* with no postrecovery mortalities. The reason that 2 animals died at 0.3 ml / l clove oil and 2-phenoxyethanol treatments was a deep knife cut from handling.

Clove oil treatments of 0.1 and 0.3 ml/l did not anaesthetize 1 animal after 30 minutes (Table 11). Omitting these animals for statistical analyses, the relaxation time of the rest animals treated with clove oil decreased with an increase in concentration (855 ± 287 seconds at 0.1 ml/l, 786 ± 248 seconds at 0.3 ml/l, 536 ± 208 seconds at 0.5 ml/l and 472 ± 139 seconds at 0.7 ml/l). Statistical analysis showed significant differences in the mean of the high concentrations of clove oil (0.5 ml/l and 0.7 ml/l) compared with low concentrations (0.1 ml/l and 0.3 ml/l; Figure 30). The recovery time did not show statistical differences among different concentrations (181 ± 89 seconds at 0.1 ml/l, 143 ± 133 seconds at 0.3 ml/l, 121 ± 90 seconds at 0.5 ml/l, and 186 ± 137 seconds at 0.7 ml/l; Figure 31). For this reason, 0.5 ml/l of clove oil is the concentration recommended to anaesthetize *Haliotis tuberculata coccinea* that are 42 - 80 mm in shell length

**Table 11** Response of *Haliotis tuberculata coccinea* to the anaesthetics. The time is given by minutes

	<u>2- phenoxyethanol</u>	<u>Clove oil*</u>			
	2 ml/l	0.1 ml/l	0.3 ml/l	0.5 ml/l	0.7 ml/l
Relaxation time	4.9 ± 0.9	>30:00§	>30:00§	8.9 ± 3.5	7.9 ± 2.3
Recovery time	7.2 ± 3.6	3 ± 1.5φ	2.4 ± 2.2φ	2 ± 1.5	3.1 ± 2.3
Mortality after 7 days	1‡	0	1‡	0	0

\* Clove oil was mixed with 50% absolute ethanol.

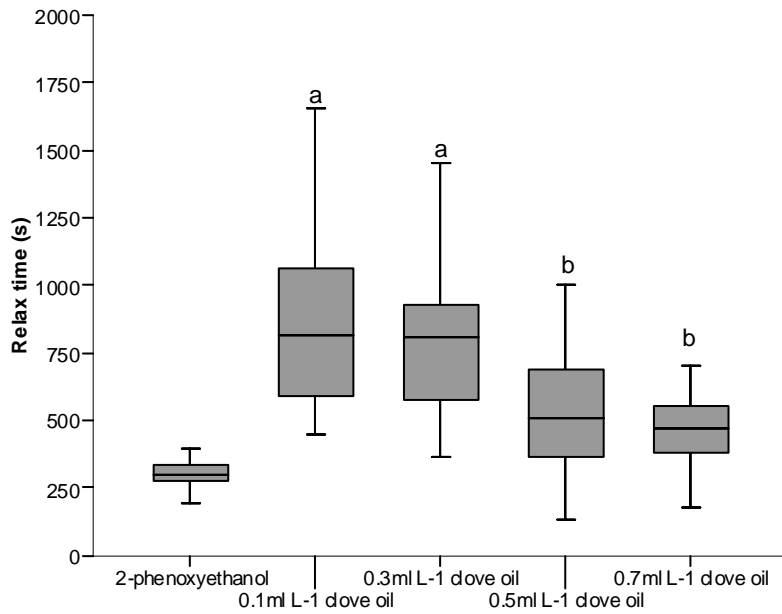
§ Once abalone was still attached to its shelter after 30 minutes.

φ Omitting the animal that did not release from its shelter.

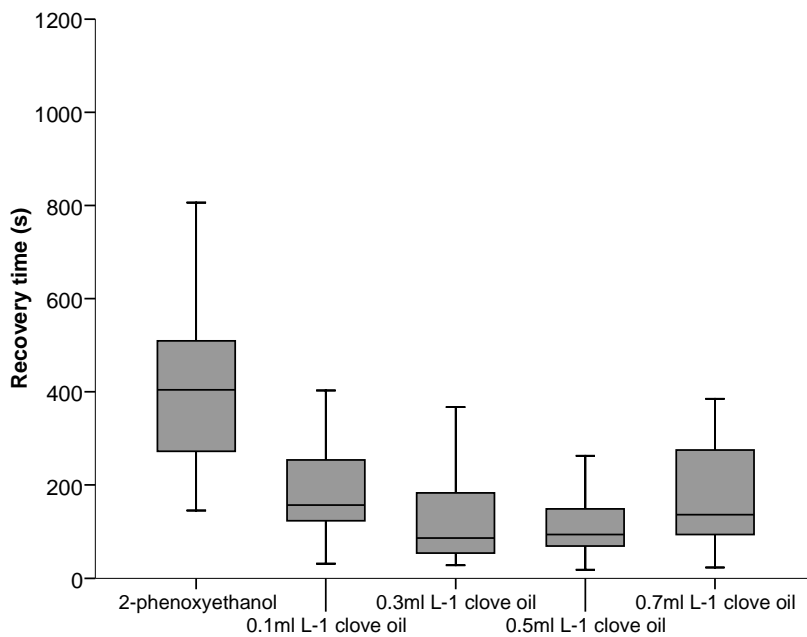
‡ The abalone that died had a deep knife cut from handling.

The relaxation time observed with 2-phenoxyethanol was less (29.9 ± 5.6 seconds), and less dispersal was observed for clove oil at the 0.5 ml/l concentration (536 ± 208 seconds; Figure 30 and Table 11). However, the recovery time was more (433 ± 215 seconds at 2 ml/l of 2-phenoxyethanol and 121 ± 90 seconds at 0.5 ml/l of clove oil), with more dispersal (Figure 31 and Table 11). Qualitatively, the effect of each chemical as a muscle relaxant was similar, producing a contracted muscle with a little exudation of mucus.





**Figure 30** Relaxation time (seconds) box plot in treatments used. Letters indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ). Animals that did not release from their shelter at clove oil concentrations of 0.1 ml/l and 0.3 ml/l were omitted from the analysis. 2-Phenoxyethanol was not considered for statistical analysis.



**Figure 31** Recovery time (seconds) box plot in treatments used. Statistical analysis did not show differences ( $P < 0.05$ ) between clove oil doses. Animals that did not release from their shelter at clove oil concentrations of 0.1 ml/l and 0.3 ml/l were omitted from the analysis. 2-Phenoxyethanol was not considered for statistical analysis.

#### 4.3.4. DISCUSSION

The relaxation time recorded for 2-phenoxyethanol ( $4.9 \pm 0.9$  minutes) was similar to that reported for *Haliotis midae* ( $2.9 \pm 2.3$  minutes) by White *et al.* (1996), however, the recovery time was much shorter ( $7.2 \pm 3.6$  minutes and  $46.0 \pm 24.6$  minutes, respectively).

Based on the results of this study, higher anaesthetic doses of clove oil resulted in similar recovery times. This observation was similar to that found by White *et al.* (1996) for  $MgSO_4$  and 2-phenoxyethanol anaesthetics in *Haliotis midae*. However, the expected results were the higher the concentration of clove oil, the longer the recovery time, as reported Seol *et al.* (2007) in common octopus (*Octopus minor*). This may be explained by the fact that higher doses induced anaesthesia quicker, thus the animals were removed from the anaesthetic bath and placed in clear water sooner than animals exposed to lower doses. Clove oil is highly lipophilic, therefore it adheres to and penetrates the gill epithelium rapidly, and is absorbed by body tissues, such as fat (Stoskopf, 1993) and brain (Summerfelt and Smith, 1990), once it is in the blood. In this way, Mylonas *et al.* (2005) considered that the shorter the exposure time to clove oil bath in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), the smaller the amount of anaesthetic absorbed by the body, and the faster its removal from the blood and recovery of the animal when it was placed in clear water. This phenomenon would be similar in abalone.

Clove oil concentrations of 0.1 ml/l and 0.3 ml/l did not anaesthetize all animals after 30 minutes; 0.5 ml/l and 0.7 ml/l did not show statistical differences with regard to relaxation time. Thus, the recommended concentration of clove oil as an anaesthetic for *Haliotis tuberculata coccinea* is 0.5 ml/l. Although the relaxation time observed at this concentration was longer than for 2-phenoxyethanol ( $8.9 \pm 3.5$  minutes and  $4.9 \pm 0.9$  minutes, respectively), its effect on animals was more dispersed in time. We consider that this aspect is an advantage in terms of handling abalone during procedures that include enumeration, pathological analysis, and measuring or weighing, because the animals release from their shelters gradually. The recovery time seen with 0.5 ml/l clove oil was less than that of 2-phenoxyethanol ( $2 \pm 1.5$  minutes and  $7.2 \pm 3.6$  minutes, respectively); this is another advantage, because the animals recover faster.

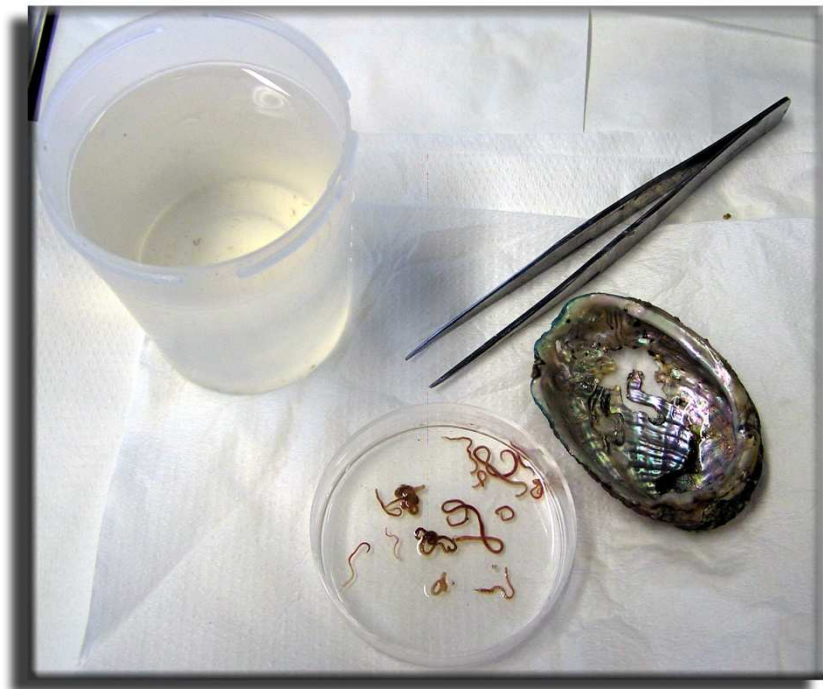
In pearl culture of abalone clove oil and 2-phenoxyethanol was not suitable for pearl nuclei insertion at the doses tested, because the recovery time of animals was less than 10 minutes, and muscle condition observed in both anaesthetic was contracted, making access to the operation site difficult. In the case of clove oil, the muscle condition observed would be

caused, in part, by the ethanol used to dissolve it, as observed by Aquilina and Roberts (2000), who used benzocaine in *Haliotis iris*.

In conclusion, the results obtained from the current study demonstrate that clove oil can be used as an effective and efficient agent for muscle relaxation of *Haliotis tuberculata coccinea*. Furthermore, in comparison with the commonly used 2-phenoxyethanol, clove oil was effective in 10-fold lower doses, the odor of clove oil was pleasant and nonirritating in contrast to 2-phenoxyethanol, and because clove oil is a plant compound, it is expected to decompose readily in the natural environment.

## 4.4. Experimento IV

### Control de Poliquetos en el Cultivo



Este experimento fue publicado en 2011 por Bilbao, A., J. Núñez, M.P. Viera, B. Sosa, H. Fernández-Palacios y C.M. Hernández-Cruz con el título de "Control of Shell-Boring Ploychaetes in *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846) Aquaculture: Species Identification and Effectiveness of Mebendazole" en el volumen 30 (2) de la revista Journal of Shellfish Research.

Este experimento fue presentado como poster en 2009 por Bilbao A., M.P. Viera, G. Courtois de Vicoze, B. Sosa, H. Fernández-Palacios y M.S. Izquierdo con el título de "Efficiency of mebendazole as antihelmitic for abalone culture" en el congreso VII Internacional Abalone Symposium en Pattaya, Thailandia.

#### 4.4.1. INTRODUCTION

The abalone found in the Canary Islands is *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846). This is a small, subtropical native species with a maximum shell length of 8 cm (Bilbao *et al.*, 2010a). Recently, the government of the Canary Islands identified *Haliotis tuberculata coccinea* as a new species for the diversification of local commercial aquaculture. Currently, techniques for the experimental culture of this species are being developed at the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Gran Canaria, Spain. The culture is based on specimens captured in their natural habitat and conditioned as broodstock at the ICCM using primarily cultured algae (*Ulva lactuca* and *Gracilaria cornea*). In 2008, an outbreak of shell-boring polychaetes affected the culture, especially the oldest specimens.

Shell-boring polychaetes belong to the family Spionidae. They bore into the shells of several mollusc taxa, including oysters, mussels, scallops, abalone and clams (Blake and Evans, 1973; Lauckner, 1983). The most serious shell-boring polychaete pests that affect abalone cultures worldwide are related to two spionid genera, *Polydora* and *Boccardia* (Lleonart *et al.*, 2003a; Simon *et al.* 2006) and to the sabellid species *Terebrasabella heterouncinata* (Leighton 1998; Simon *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2007). The impact of these pests depends on the severity of the infestation, the size of the host, the host species, the worm species, the environmental conditions, and the health of the host (Lleonart *et al.*, 2003a). High levels of infestation may lead to a significant reduction in the host's flesh condition (Handley, 1998; Simon *et al.*, 2006; Sato-Okoshi *et al.*, 2008) and may even cause mortality (Lleonart *et al.*, 2003a).

Efforts made to treat worm infestations affecting abalone species have achieved limited success. The methods tested include exposing the worms to encapsulated toxins (e.g., liposomes) that are absorbed by the shell-boring polychaetes but not by the abalone (Shields *et al.*, 1998), biocontrol agents using potential shell-boring polychaete predators (e.g., *Cirolana harfordi*) (Kuris and Culver, 1999), air-drying of spionid-infested abalones for 2-4 hours at less than 64 % humidity level (Lleonart *et al.*, 2003b), heat treatment of spionid-infested animals using seawater warmed to 28-29 °C for 48 hours (Leighton, 1998), and freshwater immersion for more than 48 h (Moore *et al.*, 2007). Recently, Simon *et al.* (2010) suggested diatom-derived polyunsaturated aldehyde 2,4-decadienal as a chemotherapeutic agent against shell-boring polychaetes. However, there are no effective treatments that, although negatively impacting the worms, do not cause any undue harm to the host abalone.

Mebendazole (methyl 5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl-carbamate) is a broad spectrum benzimidazole carbamate classically used in human and veterinary medicine to treat a wide

range of parasitic infestations (Cózar-Bernal *et al.*, 2010). This drug acts by holding back essential transport processes taking place within the parasites' intracellular microtubules. It works by inhibiting glucose uptake, thereby causing immobilization and death of the parasite. In humans, this drug has been successfully used for the treatment of nematodes (Krishnaiah *et al.*, 2001; Dayan, 2003; De Villiers *et al.*, 2005). In the veterinary field, the use of mebendazole has been approved for several mammalian species; including pregnant animals (Krízová-Forstová *et al.*, 2011), and it has proven to be very active against nematodes, lungworm (*Dictyocaulus arnfieldi*) and tapeworms (*Echinococcus* and *Taenia* spp.) (cited in C3zar-Bernal *et al.*, 2010). In aquaculture, mebendazole has been used for controlling monopisthocotylean infestations in fish (Goven and Amend, 1982; Szekely and Molnar, 1990; Buchmann and Bjerregaard, 1990; Mellergaard, 1990; Buchmann, 1993; Kim and Choi, 1998). However, mebendazole showed no significant results for the control of either the monogenean *Microcotyle* sp. in the gills of cultured *Pagrus pagrus* (Katharios *et al.*, 2006) or of the shell-boring polychaete *Boccardia knoxi* in *Haliotis rubra* (Leonart *et al.*, 2003b). However, these studies used a single application of mebendazole and, as in humans (Cañete *et al.*, 2009), it is expected that multiple mebendazole applications will be more effective in controlling the parasites affecting abalone.

This study aims to identify some of the species of shell-boring polychaetes that affect *Haliotis tuberculata coccinea* in the Canary Islands and to assess the effectiveness of multiple baths of mebendazole to control these pest species.

## **4.4.2. MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental animals and culture conditions**

The experiment was undertaken during 2008 at the ICCM, Gran Canaria Island, Spain. A total of 120 naturally infested animals (40 - 75 mm in shell length) were tagged, and an infestation ranking was assigned to each animal: low-infested, when fewer than five boring polychaete chimneys were present on the shell; highly-infested, when more than five chimneys were present and/or the external surface of the shell was partly broken. Animals were weighed to the nearest 0.1 mg for body weight and 0.1 mm for shell length, and assigned to a culture tank (an experimental unit).

The animals were reared in 12 plastic tanks of 50 l (10 abalones per replicate) containing two shelters, with 1- $\mu$ m filtered and UV radiation-sterilized seawater. Water flowed through the tanks at a rate of 5 volume / day and aeration was provided constantly. Abalone were exposed to a natural photoperiod of approximately 12 hours light /12 hours dark. Feeding was

conducted weekly using cultured mixed algae from ICCM (*Ulva lactuca* and *Gracilaria cornea*). The culture tanks were cleaned, and fecal material was removed once per week. At the same time, the uneaten macroalgae were removed and replaced with fresh algae.

### **Treatments for shell-boring polychaetes**

The effectiveness of mebendazole as an antihelmitic was evaluated at three concentrations: 120 mg/l, 160 mg/l, and 200 mg/l. Mebendazole was administered as lomper® (Esteve Laboratory, Spain) using the following concentrations: 6 ml/l, 8 ml/l and 10 ml/l with 0 ml/l as a control measure.

Every month, the abalone were transferred to 24 transparent plastic aquaria with a 2-l capacity (5 abalones per aquaria), and mebendazole was added to the desired concentration. The animals were exposed to the solution as recommended in the drug directions for human use. Abalone were exposed to 3 mebendazole baths over a 3-day period (one-time 3-hours bath given for 3 consecutive days). After each bath, the abalones were returned to their original culture tanks until the following day. After these 3 days, the abalone were kept in their original culture tanks for a term of 1 month. Each month, as a result of the effect of mebendazole, moribund and/or dead shell-boring polychaetes became detached from the burrows and were found at the bottom of the tank during the first 15 days after the baths of mebendazole were applied. The shell-boring polychaetes expelled from the shells were counted, collected, and fixed in 10% buffered formaldehyde for subsequent identification. This process was repeated the following month and, for 3 consecutive days, a one-time 3-hours bath was given using lomper®. Throughout the 15 days after the baths, the moribund and/or dead shell-boring polychaetes were counted, and samples were taken for subsequent identification. This process was repeated month after month until no moribund and/or dead shell-boring polychaetes were found after the application of the baths of mebendazole.

### **Expulsion methods, quantification and identification of shell-boring polychaetes**

The amount of shell-boring polychaetes not dying as a result of the overall treatment with mebendazole, and the amount of shell-boring polychaetes in the control group were determined using a chemical vermifuge to expel the shell-boring polychaetes from their burrows (Lleonart *et al.*, 2003a). This was a solution of 500 ppm phenol in seawater (Mackenzie and Shearer, 1959).

At the end of the experiment, the surviving abalones (including those in the control group) were shucked, and each shell was placed in a 200-ml container with the vermifuge

solution for 5 hours (Figure 32). This allowed us to determine the abalone containing shell-boring polychaetes and the abalone that were free of the pest. After exposure, the solution was drained through a 90- $\mu$ m sieve, and the shell-boring polychaetes were rinsed and transferred to Petri dishes for examination. In addition, the surfaces of the abalone shells were examined using a magnifying glass to identify any shell-boring polychaetes only partly expelled from their burrows.



**Figure 32** Shell of a highly infested abalone of the control group placed in a container of vermifuge solution. The live shell-boring polychaetes are expelled from the shell when exposed to the vermifuge.

Furthermore, during the performance of the study, whenever an abalone appeared dead in the culture tanks, its shell was immersed in the vermifuge solution to expel, count, and identify the amount of live shell-boring polychaetes found in the abalone. This was the same procedure carried out at the end of the experiment with surviving abalone.

To calculate the total amount of shell-boring polychaetes present at the start of the trial, the amount of dead shell-boring polychaetes and the number of shell-boring polychaetes resistant to the action of mebendazole must be added. The estimation of the initial amount of shell-boring polychaetes corresponded to each replication tank. The amount of shell-boring polychaetes at the start of the study equals the amount of shell-boring polychaetes expelled with the lomper® solution plus the amount of shell-boring polychaetes expelled with the vermifuge solution and found in the dead abalones plus the amount of shell-boring polychaetes expelled with the vermifuge solution at the end of the overall treatment



The efficacy rate of lomper® was defined as the percentage of shell-boring polychaetes that died after the mebendazole baths over the complete treatment, and this rate was calculated for each replication:

$$\text{Efficacy rate (EF)} = 100 - \% \text{ of surviving shell-boring polychaetes}$$

$\% \text{ Surviving shell-boring polychaetes} = (\text{Amount of shell-boring polychaetes expelled with the vermifuge at the end of the complete treatment} \times 100) / \text{Amount of shell-boring polychaetes at the start of the study}$

The shell-boring polychaete species were identified on the basis of fifth setiger chaetae, postomium and pygidium morphology, and branchiae distribution. Descriptions of species encountered in the research are given in Pascual and Núñez (1999).

## **Growth**

Because growth rates in abalone are age dependent, growth was estimated after separating individuals into 2 groups according to their shell length (40 - 59 mm and 60 - 79 mm). The specific growth rate for weight (SGR) and the percent weight gain (WG) were estimated as:

$$\text{Specific growth rate for weight (SGR)} = 100 * (\text{Ln } W_t - \text{Ln } W_0) / t$$

$$\text{Weight gain (WG)} = 100 * (W_t - W_0) / W_0$$

Where  $W_0$  is the mean initial body weight (in grams),  $W_t$  is the mean final body weight (in grams), and  $t$  is the experimental duration (in days).

## **Statistical methods**

Statistical analyses were tested using an 1 factor ANOVA. Data were tested for normality prior to analysis using the Kolmogorov-Smirnov test. Bartlett's test was used to test for

homogeneity of variances (Zar 1996), and Tukey's multiple comparison test was used in pairwise comparisons when significant differences ( $P < 0.05$ ) were determined.

### **4.4.3. RESULTS**

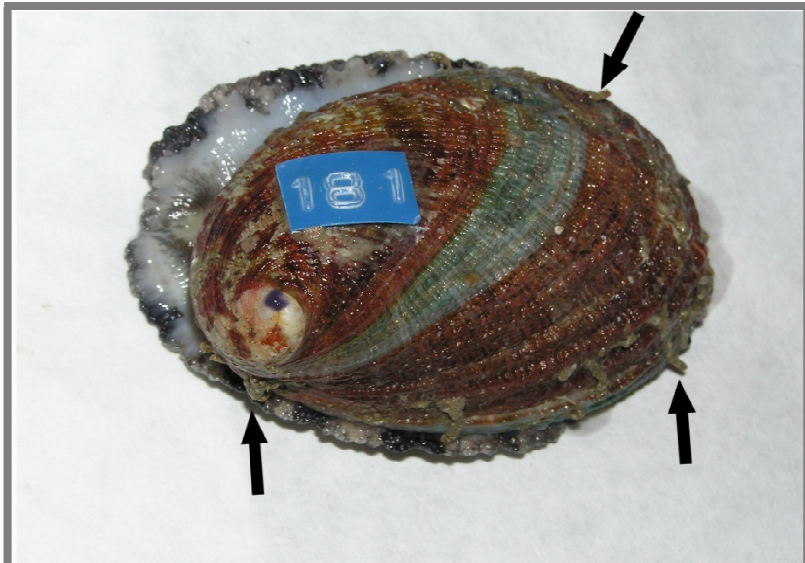
#### **Shell-boring polychaetes**

The shell-boring polychaete species found in the shells of abalone were identified as *Polydora hoplura* Claparède (1870). These large worms were 6.50 mm in length and 0.5-0.6 mm in width, with 56 setigers. The prostomium was fairly deeply notched, and often blackened by four small eyes. Notosetae were absent on the first setiger, and there were only ventral capillary setae. Branchiae start from setiger 7 and were absent in posterior region. Enlarged hooks (3-4) on the fifth setiger each had a lateral twisted spur, and on setiger 7 and there were 2-3 bidentate sigmoid hooded hooks in the ventral position. On the last setigers, the notosetae included one enlarged, yellow, curved hook. The pygidium was open and shaped like a suction cup, with a dorsal notch and, occasionally was dark in color.

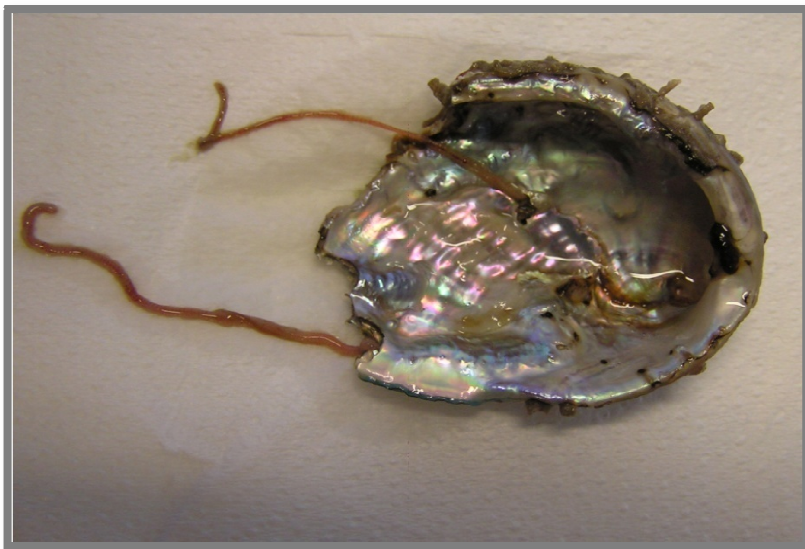
The chimneys created by *Polydora hoplura* on the outside surface of the abalone shell were initially located along the growing edge, although the worms were also capable of burrowing throughout the shell. When the infestation progressed, the shell-boring polychaetes tended to be evenly distributed within the shell. The chimneys were gray because of the accumulation of sediment (Figure 33). As the infestation became increasingly heavy, the abalone formed blisters by shell material secretion (i.e., conchiolin covered with nacre) that projected into the mantle cavity to isolate the shell-boring polychaetes. The shells were occasionally broken in the area of the blisters. In these cases, the abalone were extremely vulnerable and, in most cases, died (Figure 34). However, some of them were able to reconstruct the shell and, consequently, the shell became deformed.

#### **Treatment against shell-boring polychaetes**

The initial number of shell-boring polychaetes in the abalone shells was equal ( $P > 0.05$ ) in all replicates (Table 12). At the beginning of the trial, the results showed a positive association between the number of shell-boring polychaetes expelled and the concentration of mebendazole used (Figure 35). Afterwards, this relation disappeared and it was necessary to apply the drug 21 times over a term of 7 months (one-time 3-hours bath given for 3 consecutive days per month) to expel most shell-boring polychaetes from the abalone shells, regardless of the mebendazole concentration used.



**Figure 33** Typical chimneys of *Polydora hoplura* (arrows).



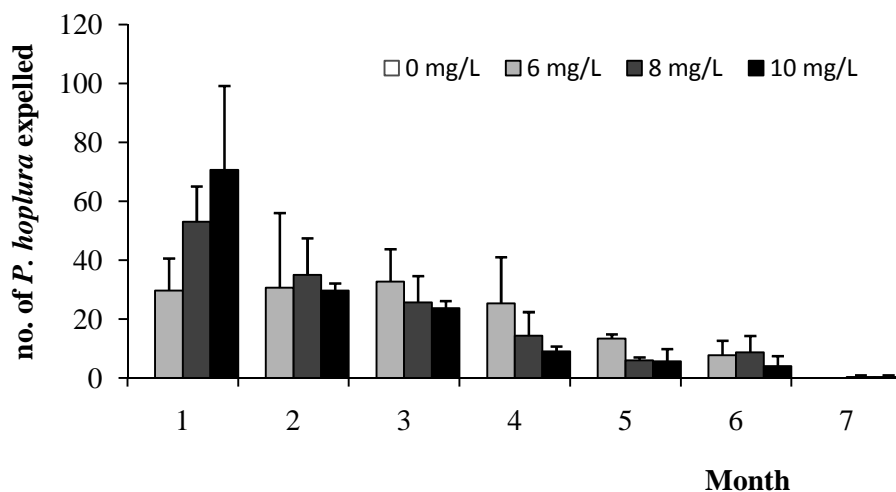
**Figure 34** Typical blisters projecting into the mantle cavity as consequence of *Polydora hoplura* infestation in a highly-infested abalone.

The efficacy of lomper® was similar in all tested doses at a rate of approximately 99% (Table 12). There was no statistical difference in abalone mortality among the control and the groups that were administered different concentrations of lomper® (Table 12). It is worth mentioning that mortality was only observed in highly infested animals. A similar situation was found with regard to the number of remaining shell-boring polychaetes that were expelled

using the vermifuge drug. Only a few highly infested abalone still contained shell-boring polychaetes at the end of the experiment, whereas no shell-boring polychaetes were found in the abalone that originally had low-level infestations.

**Table 12** The initial amount of *Polydora hoplura*, efficacy rate of lomper® (Esteve Laboratory, Barcelona, Spain) and abalone mortality during the course of the study

lomper® concentration	Initial amount of <i>P. hoplura</i>	Abalone mortality %	Efficacy rate of lomper® %
Control (0 ml/l)	185.3 ± 41.0	20.0 ± 10.0	
6 ml/l	146.3 ± 14.9	16.7 ± 5.7	99.1 ± 1.0
8 ml/l	146.7 ± 23.9	13.3 ± 15.3	98.9 ± 0.9
10 ml/l	150.0 ± 29.3	20.0 ± 0.0	98.8 ± 1.7



**Figure 35** The number of shell-boring polychaetes expelled after 3 baths of mebendazole in each month.

## Growth

The size class of 40-59 mm in shell length had a higher specific growth rate than the size class of 60-75 mm in shell length, because these individuals were both younger and less infested (Tables 13 and 14).

The SGR and WG rates did not differ statistically among all the mebendazole treatments and the control group (Tables 13 and 14). Thus, this result suggested that the mebendazole did not affect significantly the growth of the abalone during the period of study. However, it is worth noting that WG of the bigger abalones (60-79 mm in shell length) was positive in the control and negative in the various treatments.

**Table 13** Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) of 60 - 79 mm in shell length of *Haliotis tuberculata coccinea* during experiment

<b>lomper® concentration</b>	<b>N</b>	<b>SGR (%/day)</b>	<b>WG (%)</b>
Control (0 ml/l)	10	0.01 ± 0.06	3.40 ± 14.52
6 ml/l	12	- 0.02 ± 0.05	- 4.82 ± 10.48
8 ml/l	11	- 0.02 ± 0.04	- 4.52 ± 9.96
10 ml/l	9	- 0.02 ± 0.04	- 4.68 ± 8.68

Values in the same column are not significantly different (P>0.05).

**Table 14** Specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) of 40 - 59 mm in shell length of *Haliotis tuberculata coccinea* during experiment

<b>lomper® concentration</b>	<b>N</b>	<b>SGR (%/day)</b>	<b>WG (%)</b>
Control (0 ml/l)	11	0.12 ± 0.10	35.15 ± 28.54
6 ml/l	15	0.08 ± 0.11	24.00 ± 30.09
8 ml/l	11	0.03 ± 0.06	8.09 ± 16.56
10 ml/l	11	0.09 ± 0.08	25.50 ± 25.13

Values in the same column are not significantly different (P>0.05).

#### 4.4.4. DISCUSSION

The mudworm infesting *Haliotis tuberculata coccinea* in the ICCM was identified as *Polydora hoplura*. This is a common pest in cultured abalone, as noted by several authors (Leonart *et al.*, 2003a, 2003b; Simon *et al.*, 2006). This shell-boring polychaete species has been found along the coast of Europe, South Africa, New Zealand and Australia (Ruellet, 2004). In the Canary Islands, *Polydora hoplura* has a patchy distribution over the mesolittoral and infralittoral areas, and usually burrows into substrata containing calcium carbonate, such as stones, encrusting coralline algae, and the shells of mussels and sponges (Pascual and Núñez, 1999). The current study cites, for the first time, *Polydora hoplura* associated with *Haliotis tuberculata coccinea*.

The infestation develops throughout the planktonic larval stages of *Polydora hoplura* (Blake and Evans, 1973). Because this species can reach its sexual maturity in a few months, it is capable of rapid colonization (cited in Royer *et al.*, 2006). Under culture conditions, as observed by other authors (Leonart *et al.*, 2003a; Simon *et al.*, 2006), infestations can become sufficiently heavy to deform and even break the shell of highly infested abalone. Thus, although the meat quality is not altered by the infestation (Gray, 2003), these animals lose their commercial value. No shell deformation was observed in low-infested animals according to the results obtained by Simon *et al.* (2004). Thus, we believe that only low-infested animals are really curable (Figure 36).



**Figure 36** Low-infested (left) and highly infested (right) abalone recovering after the treatment of mebendazole. Highly infested animals were unsightly to the consumer.

In the current study, the efficacy rate of all the mebendazole doses tested (120 mg/l, 160 mg/l and 200 mg/l) in multiple applications were higher (EF 98.8-99.1%) than that found by Lleonart *et al.* (2003a) in a single application (200 mg/l and EF 32.5%) against the shell-boring polychaete *Boccardia knoxi* in the abalone species *Haliotis rubra*. Therefore it can be argued that when using mebendazole, which is a broad-spectrum anthelmintic drug (Křízová-Forstová *et al.*, 2011), multiple applications are more effective than single applications for eradicating shell-boring polychaete pests.

Although the growth rate results did not show statistical differences among the various mebendazole treatments and the control group, the bigger abalones (60-79 mm in shell length) lost weight. Taking into account that these animals were highly infested, this result confirms the observations of previous studies, which associated a high level of infestation with a loss in abalone condition (Lleonart *et al.*, 2003a; Simon *et al.*, 2006). This may be associated with the abalone tendency to respond to the infestation by depositing a layer of nacre over the worms to isolate them. The cost of continuously forming this layer is believed to result in a significant detriment to abalone condition (Handley, 1998).

Our results suggested that the repeated application of mebendazole was more important than the concentration used. At this point, it would be interesting to test lower concentrations of the drug in multiple applications; however, it should be taken into consideration that the extended exposure to subtherapeutic dosages may result in mebendazole-resistant parasite populations (Buchmann *et al.*, 1992). It is also noteworthy that, among the causes of parasite resistance to drugs, one of them is the presence of active anthelmintics in the natural environment of the parasite (FAO, 2003; Křízová-Forstová *et al.*, 2011). This may be due to the disposal of drug residues directly into the environment along with the wastewater from the aquaculture facilities.

In conclusion, the current study proved that using 120 mg/l mebendazole applied 21 times for 7 months (one-time 3-hours bath given for 3 consecutive days per month) eradicated the *Polydora hoplura* pest in approximately 99 % of highly infested abalones. However, it should be noted that the use of this type of chemical drug is a nonrenewable resource (Vial *et al.*, 1999; Geary *et al.*, 1999), in other words, if the parasites develop a resistance to the drug, the product will become unusable. Furthermore, total dependence on a single parasite control method has proved to be poorly sustainable and not profitable in the long term (Waller, 1997; Barger, 1999). Following the recommendations of FAO (2003), it is preferable to use the anthelmintic as a timely support for a rational and sustainable control strategy and not as the exclusive tool for such purposes.

## 4.5. Experimento V

### Control de Reproducción



Este experimento ha sido enviado para su revisión en 2011 por Bilbao, A., M.P. Viera, B. Sosa, H. Fernández-Palacios y C.M. Hernández-Cruz con el título de "The Reproductive Potential throughout the Entire Year and Optimal sperm concentration in the Fertilization Success of *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846) Reared in Captivity" a la revista *Invertebrate Reproduction and Development*.



### 4.5.1. INTRODUCTION

The abalone found in the Canary Islands is *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve and it is synonymous with *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck. This is a small subtropical native species with a maximum shell length of 8 cm (Bilbao *et al.*, 2010a). Recently, the local Government of the Canary Islands identified *Haliotis tuberculata coccinea* as a new species intended for the diversification of local commercial aquaculture. Currently, various techniques for the experimental culture of this species are being developed at the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) (Peña, 1986; Viera *et al.*, 2005, 2011; Courtois de Vicose *et al.*, 2007, 2010; Bilbao *et al.*, 2010 a,b, 2011).

An important aspect to be considered in the culture of any new species is the control of its reproduction. The natural spawning period of the temperate abalones species (i.e. *Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*) is limited to a few months when the water temperature reaches its highest levels (Hanh, 1989). Under culture conditions, in order to extend the period of spawning throughout the entire year, some authors suggest a broodstock conditioning at a constant temperature (16 °C and 17 °C for *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata*, respectively) with an adequate diet during 10 and 26 weeks in order to induce spawning after this period (Grubert and Ritar, 2005; Freeman *et al.*, 2006). However, the reproductive cycle of tropical species (i.e. *Haliotis asinina*) extends almost throughout the year, and a broodstock conditioning during 15-35 days with an adequate diet and with the same water temperature of its natural environment may be enough to obtain natural spawning (Capinpin *et al.*, 1998; Bautista-Teruel *et al.*, 2001). In natural populations of *Haliotis tuberculata coccinea*, a subtropical species, the maximum reproductive activity occurs between August and February (with an average temperature of 18-23 °C in the Canary Island waters), although some mature individuals and some spawning events are also observed throughout the entire year (Bilbao *et al.*, 2010a). Under culture conditions, spontaneous spawning events have been sporadically observed (personal observation) around the lunar phase changes. However, these events are not regular. Thus, the most suitable procedure to control the spawning of *Haliotis tuberculata coccinea* and to schedule the tasks of a hatchery (i.e. the preparation of culture tanks for the culture of larvae and post-larvae) is the spawning induction of mature animals.

The most common methods used to induce spawning in abalone species are the ultraviolet method (Kikuchi and Uki, 1974a) and the hydrogen peroxide method (Morse *et al.*, 1977). Peña (1986) adapted the hydrogen peroxide method for *Haliotis tuberculata coccinea* and achieved satisfactory results (100% spawning rates for males and females). However, the

successful spawning induction largely depends on the maturation degree of broodstock and the fertilization success (Hanh, 1989).

The most reliable method to verify the maturity state of broodstock is by using histological techniques: the measurement of the oocyte diameter in females, and the gonad morphology in both females and males (Hanh, 1989). However, the application of these techniques involves sacrificing the specimens. The gonadosomatic index proposed by Uki and Kikuchi (1984) is commonly used in abalone hatcheries. This index divides the gonad maturation into 4 stages which are visually assessed: stage 0 does not distinguish the sex of the animal and, as it develops (stages 1 and 2), the gonad increases its volume and appears more protuberant until reaching the highest stage of maturity (stage 3). Recent histological studies on *Haliotis laevigata*, a warm water species, showed that this index is not suitable to determine the maturity stage of a broodstock batch conditioned at a constant temperature (Freeman *et al.*, 2006). On the contrary, Setyono (2003) finds a relationship between the gonad volume visually assessed and the sexual maturity stages histologically assessed (i.e. maturing and mature stages) in *Haliotis asinina* (tropical species). In the present paper, we have studied the histological relationship between the amount of germ cells throughout the different stages and the visual gonadosomatic indexes and secondly, the relationship between this index and the area of the ovary. This study will allow us to visually determine the most appropriate moment to induce spawning in *Haliotis tuberculata coccinea* females.

The fertilization of gametes in abalone occurs externally (Hanh, 1989). The usual practice in an abalone farm consists of inducing spawning by separate sexes. Therefore, the amount of sperm used to fertilize the eggs will determine the induction success, since using an inadequate amount of sperm for the fertilization may result in a null fertilization rate or in the dissolution of the egg membrane due to polyspermy, resulting in a subsequent abnormal embryonic and larval development (Kikuchi and Uki, 1974c; Encena *et al.*, 1998; Clavier, 1992b). Thus, it is essential to know the optimal sperm concentration necessary to reach the highest fertilization rate. The optimal concentration of sperm varies among abalone species and these amounts range between  $10^3$  and  $10^6$  spermatozooids / ml (Kikuchi and Uki, 1974c; Leighton and Lewis, 1982; Clavier, 1992b; Encena *et al.*, 1998; Babcock and Keesing, 1999). In *Haliotis tuberculata coccinea*, the optimal sperm concentration is still unknown.

The main objective of this paper is to advance the reproduction control of *Haliotis tuberculata coccinea*. A histological study of the visual sexual maturity index proposed by Uki and Kikuchi (1984) has been carried out in order to determine the most appropriate moment to induce spawning. Secondly, the reproductive potential (i.e. fecundity, number of individuals that

reached the full mature stage, the response to spawning induction and the number of spawning events) of *Haliotis tuberculata coccinea* under culture conditions and inducing spawning on a monthly basis has been also studied. Furthermore, an experiment was carried out so as to find the optimal sperm concentration necessary for the fertilization. The results will provide *Haliotis tuberculata coccinea* hatcheries with essential information for their culture purposes.

## 4.5.2. MATERIALS AND METHODS

### Gonad index

In order to evaluate the relationship between the macroscopic gonad appearance and the detailed structural changes associated with maturation stages, the visual gonad index (VGI) of 39 wild caught females was evaluated and classified into four gonad stages according to the classification proposed by Uki and Kikuchi (1984): 0= sex indistinguishable; 1= sex distinguishable; thin gonad with pointed tip; 2= gonad partially enlarged with pointed tip; 3= gonad swollen with rounded tip (Figure 37). Females were ranging between 35 and 64 mm in shell length, above the first sexual maturation shell length for this species. The conical appendages were carefully removed and fixed in 10% buffered formaldehyde for the histological study. After 24-48 hours, they were dehydrated, embedded in paraffin wax, sectioned into cross-sections (4-5  $\mu\text{m}$  thick), and stained with Harris' hematoxylin-eosin stain. We identified morphologically 150 oocytes for each gonad at basal, middle and apical regions (Young and DeMartini, 1970) according to the results obtained by Bilbao *et al.* (2010a) in the oogenetic process of *Haliotis tuberculata coccinea*. We named early stages of oocytes (stages 1, 2 and 3 oocytes), premature oocyte stage (stage 4 oocyte) and full mature oocyte stage (stage 5 oocyte). Likewise, the middle region of each conical appendage was photographed and a cross section area was estimated using the Image Pro-Plus software.

### The reproductive potential of females

Broodstock were collected on 1 December 2006 by diving at a depth shallower than 10 m at El Castillo del Romeral Bay, Gran Canaria Island. The specimens were held in flow-through tanks at ambient temperature for 20 days. During this time it was not noticed that any animals spawned. On 20 December 2006, 80 females (45-77 mm in shell length) and 40 males (49-70 mm in shell length) were measured, weighed, tagged and VGI assessed according to the criteria described above. Individuals were randomly assigned by sex to 12 tanks of 60 l of capacity (10 individuals per tank). Each tank had a perforated basket in suspended that allowed separating

the animals and the feces. Likewise, two shelters were placed in each tank. Filtered sea water (50  $\mu\text{m}$ ) was provided with constant aeration and water flowed through the tanks at a rate of 5 volume / day. Abalones were subjected to a natural photoperiod of approximately 12 hours light / 12 hours dark. Animals were fed a diet of mix macroalgae (*Ulva rigida* and *Gracilaria cornea*) cultured at the laboratory biofiltration system of the ICCM. The experimental tanks were cleaned and fecal material removed once per week. Same day, the uneaten macroalgae were removed and replaced with fresh algae.



**Figure 37** The stage 3 of visual gonad index in *Haliotis tuberculata coccinea*. Left: a female; right: a male.

Once a month, broodstock were inspected visually for ripeness based on the VGI. Only individuals in stage VGI 3 were induced to spawn two days before the full moon according to the results obtained in the histological study (Figure 37). The method to induce spawning was the hydrogen peroxide described by Morse *et al.* (1977) and adapted for this species by Peña (1986). Each mature individual was deposited in a plastic aquarium of 2 l of capacity. Fecundity was considered as the total number of eggs released after 5 hours of the spawning induction and was calculated volumetrically counting 3 samples of 3 ml. Likewise individuals were weighed and before and 48 hours after each spawning induction.

### **Determination of optimal sperm concentration**

Male and female abalone broodstock were inspected visually for ripeness based on the VGI. At least 30 abalone broodstock of each sex were induced to spawn according to the hydrogen peroxide method described for this species by Peña (1986) in the afternoon (17:00). Animals were monitored until they spawned (20:00–03:00). The concentration of the sperm stock solution was determined using a haemocytometer as described by Hanh (1989). The eggs

concentration was determined volumetrically: the spawned eggs were immediately separated from the females with a siphon and were concentrated into a known volume of clean seawater. The water containing the eggs was gently stirred to ensure a homogenous distribution of eggs through water column, and three subsamples were taken for estimating the amount of eggs released. One thousand eggs were placed in 250 ml glass containers with 50 ml of 1 µm filtered ultraviolet-irradiated seawater at ambient temperature (23 °C). Eggs were fertilized within 1 hour after spawning using freshly-spawned sperm. The appropriate volume of stock sperm suspension was added to make final concentrations of  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  spermatozooids / ml into each container. Each treatment had three replicates. The containers were immediately filled to 100 ml and left undisturbed for 20-30 minutes to allow the eggs to be fertilized and settle on the bottom of the container. The water was siphoned to the 25 ml mark to remove excess sperm, and water was added to 100 ml. This procedure was repeated at least three times to remove excess sperm (Encena *et al.*, 1998). Percentage fertilization was estimated by direct counts of cleaving eggs after 3 hours. After 15 hours, 3 samples of 3 ml were taken and direct counts of normal and abnormal trochophores were made.

### **Statistical analysis**

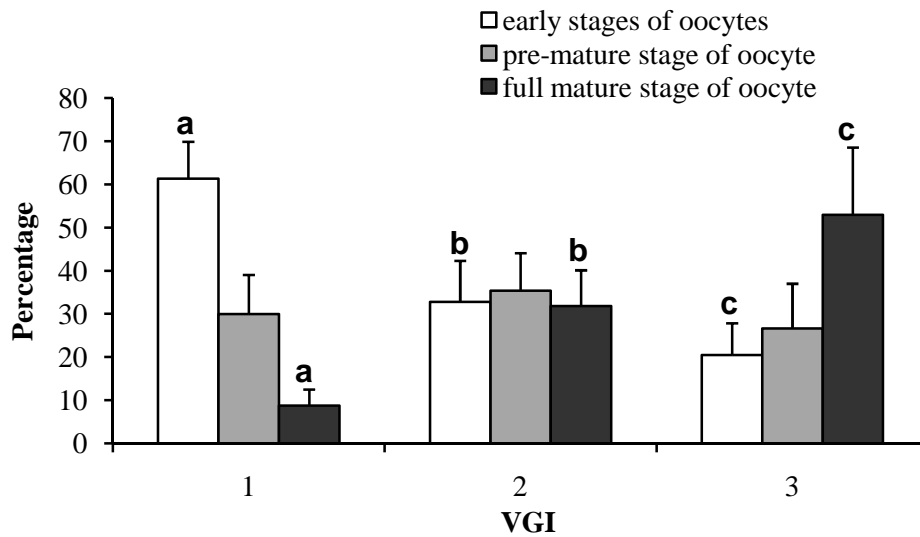
Statistical analyses were tested using one factor ANOVA. Data was tested for normality prior to analysis using the Kolmogorov–Smirnov test. Bartlett's test was used to test for homogeneity of variances (Zar, 1996) and Tukey multiple comparison test was used in pair-wise comparisons when significant differences ( $P < 0.05$ ) were determined.

## **4.5.3. RESULTS**

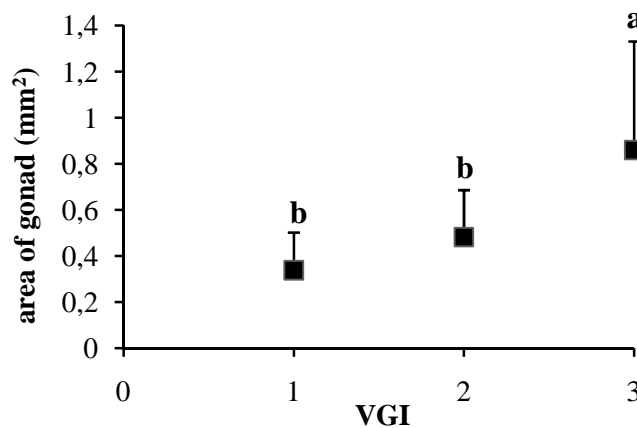
### **Gonad index**

The stage VGI 0 was not found in broodstock caught from natural population at the beginning of December 2006 neither among the conditioning period of year-round. The histological study showed that the different stages of oocytes were present in the stages VGI 1, 2 and 3. The percentage of early stages oocytes significantly decreased ( $61.28 \pm 8.6$  %,  $32.80 \pm 9.5$  % and  $20.46 \pm 7.4$  % for VGI 1, 2 and 3 respectively) as gonad ripened, while the full mature oocytes significantly increased ( $8.79 \pm 3.7$  %,  $31.82 \pm 8.3$  % and  $52.93 \pm 15.6$  % for VGI 1, 2 and 3 respectively) and the percentage of pre-mature stage of oocyte remained constant ( $29.92 \pm 9.1$  %,  $35.38 \pm 8.7$  % and  $26.61 \pm 10.4$  % for VGI 1, 2 and 3 VGI) (Figure 38). These results suggested that *Haliotis tuberculata coccinea* is partial spawner species. The gonad area

increased in relation to the different stages of VGI (Figure 39). The highest value was observed in the stage VGI 3 ( $0.86 \pm 0.47$ ) and it was significantly greater than those observed in the stages VGI 1 and 2 ( $0.34 \pm 0.16$  and  $0.48 \pm 0.20$  respectively).



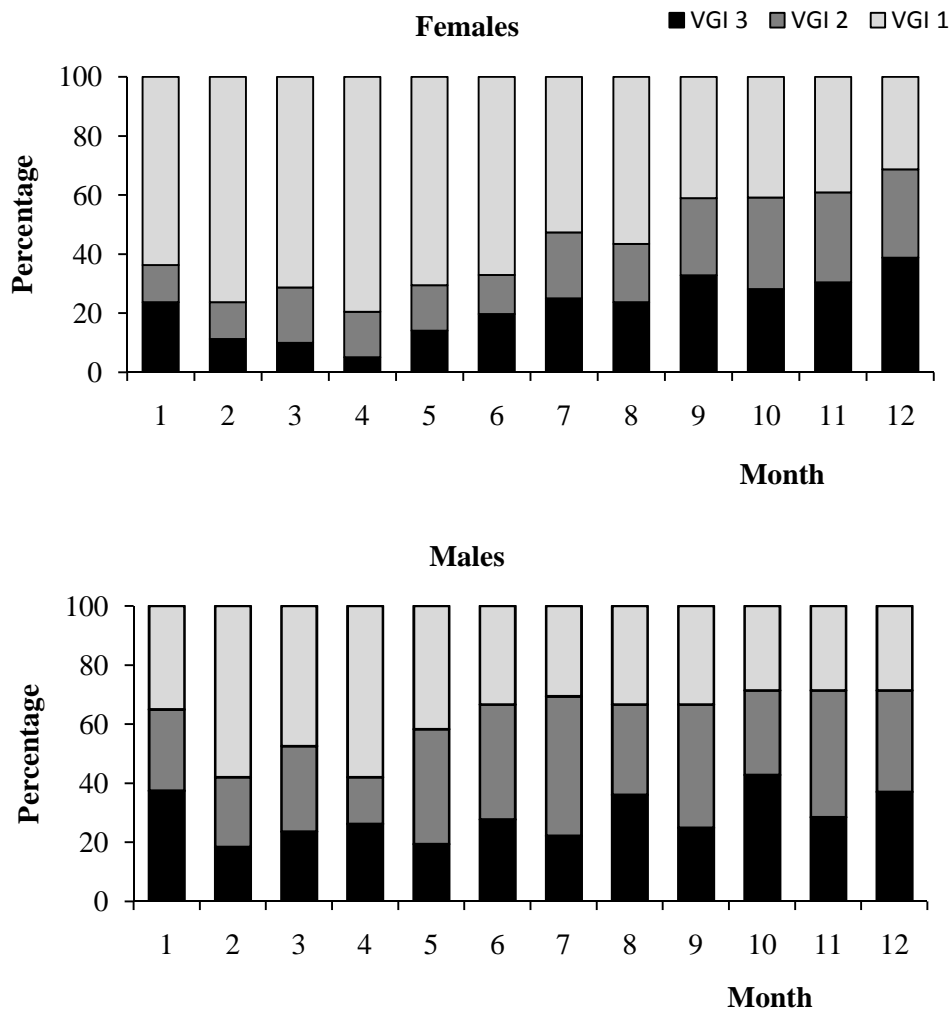
**Figure 38** Percentage of the different stages of oocytes for each visual gonad index (VGI) in *Haliotis tuberculata coccinea*. Vertical bars indicate standard error of means. The same color column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) ( $N = 150 \times 39$ ).



**Figure 39** The relationship of the ovarian area ( $\text{mm}^2$ ) and the 3 stages of visual gonad index (VGI) in *Haliotis tuberculata coccinea*. Vertical bars indicate standard error of means. Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) ( $N = 36$ ).

The results showed that the stages VGI 1, 2 and 3 were present in all months suggesting a reproductive cycle throughout the entire year in *Haliotis tuberculata coccinea* reared in captivity. The high percentages of females and males in stages VGI 2 and 3 were observed

between May and January and the low percentages between February and April (Figure 40). The maximum activity of broodstock coincided with the maximum temperature registered (Table 15). During the period of study, of total number of individuals conditioned, 24 females and 15 males did not research the stage VGI 3.



**Figure 40** Monthly changes in the percentage of the 3 stages of visual gonad index (VGI) for females (N = 80) and males (N = 40).

### The reproductive potential

The survival rate was 83.7 % for females and 87.5 % for males during the course of the study. Twenty five females and 17 males responded satisfactory to the spawning induction. Some specimens spawned several times through the entire year; in the case of females: 4 % four times a year, 16 % three times, 20 % two times and 60 % once and, in the case of males: 11.8 % spawned four times through the entire year, 23.5 % three times, 35.3 % two times and 29.4 %

once. The monthly spawning response in individuals with a VGI 3 was  $19.3 \pm 10.3$  % in females and  $30.3 \pm 14.6$  % in males during the period of study (Table 15).

**Table 15** Response of *Haliotis tuberculata coccinea* to the spawning induction throughout the entire year, temperature (T) at the time of spawning and monthly distribution of the fecundity after the spawning induction (S = individuals spawned, N = specimens stimulated)

Month	T (°C)	Males		Females		Fecundity
		Individuals conditioned	Individuals S/N	Individuals conditioned	Individuals S/N	
January	19.5	40	5/10	80	9/19	675,435
February	19.3	38	4/13	80	3/9	253,498
March	19.1	38	5/16	80	2/8	120,678
April	19	38	0/15	78	0/4	0
May	21	36	7/10	78	7/11	1,549,212
June	23	36	2/12	76	6/15	362,786
July	24	36	3/9	76	7/19	645,382
August	25	36	5/8	76	10/18	1,768,593
September	23	36	1/4	73	8/24	536,728
October	24	35	0/2	71	10/20	856,432
November	22	35	0/3	69	12/21	2,082,388
December	20	35	1/7	67	11/26	1,587,643

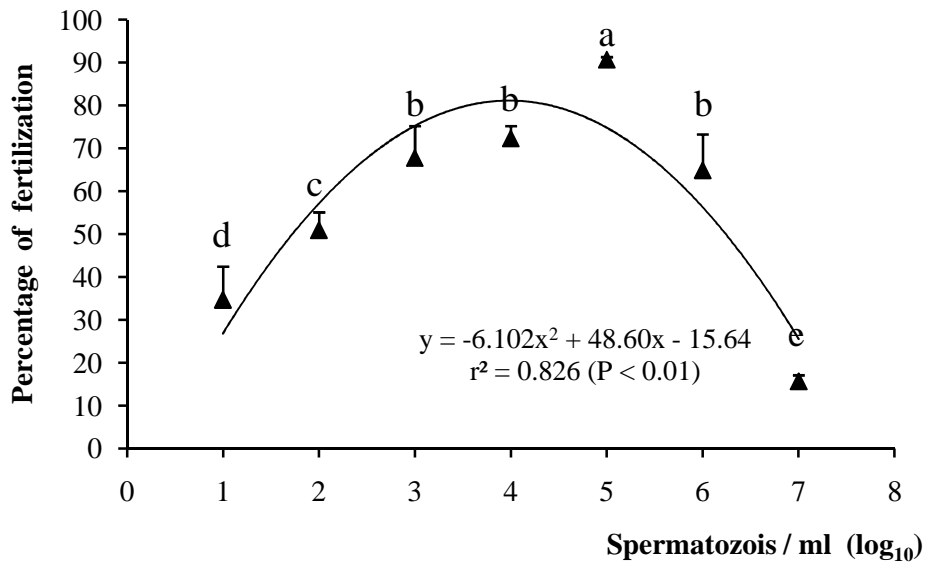
Fecundity after spawning induction did not show any relationship related to the size of animals. The monthly distribution of fecundity is given in the Table 15; we obtained a total of 10,438,775 eggs. The results showed that all individuals lost weight after 48 hours of the spawning induction. The weight loss of individuals that spawn was significantly greater ( $3.29 \pm 1.98$  g) than those failed to spawn ( $1.98 \pm 1.81$  g).

### Optimal sperm concentration

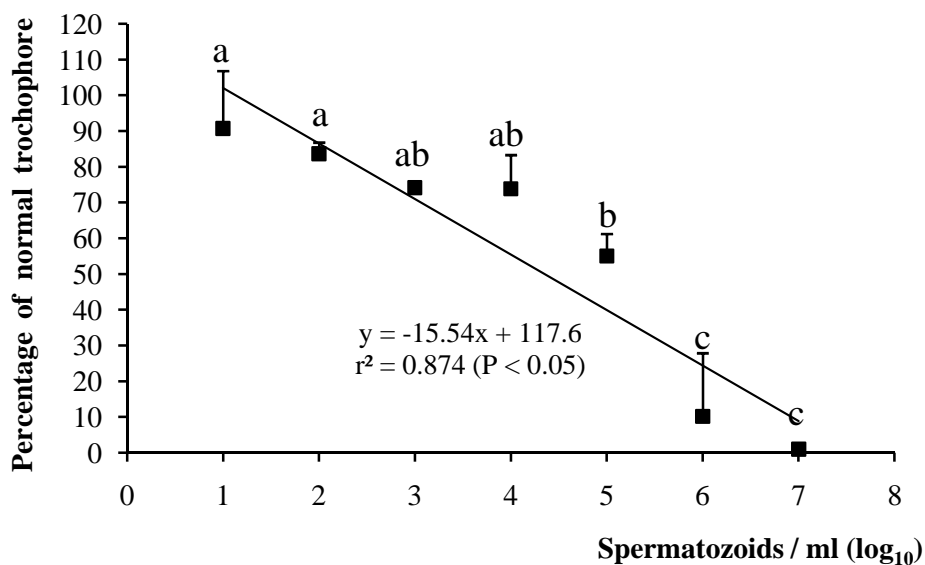
The concentration of sperm had an obvious effect on fertilization success of *Haliotis tuberculata coccinea* with a polynomial correlation ( $P < 0.05$ ) between both parameters (Figure 41). The maximum fertilization rate ( $90.7 \pm 0.56$  %) was obtained with  $10^5$  spermatozooids / ml and this value was significant higher than those observed with others sperm concentrations. The fertilization rate obtained with  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^6$  spermatozooids / ml was similar and was ranging from 64.9 to 72.33 %. The fertilization rates significantly decreased in the following sperm



concentrations  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^7$  spermatozooids / ml ( $50.93 \pm 4.14$ ,  $34.7 \pm 7.75$  and  $15.73 \pm 1.35$  % respectively). Lysis of the egg membrane occurred with  $10^6$  and  $10^7$  spermatozooids / ml.



**Figure 41** Relationship between sperm concentration and percentage of fertilization in *Haliotis tuberculata coccinea*. Vertical bars indicate standard error of means. Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 42** Relationship between sperm concentration and percentage of normal trochophore larvae in *Haliotis tuberculata coccinea*. Vertical bars indicate standard error of means. Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

The effects of seven sperm concentrations (spermatozoids / ml) on the normal trochophore larvae are showed in the Figure 42. The sperm concentrations ranging from  $10^1$  to  $10^4$  spermatozoids / ml gave consistent normal trochophores (ranging from 90.73 to 73.83 %) with no significant differences between these densities. The percentage of normal trochophore decreased significantly at higher concentrations of  $10^5$  to  $10^7$  spermatozoids / ml (ranging from 55.03 to 1 %). We found a negative correlation ( $P < 0.01$ ) between both parameters.

#### **4.5.4. DISCUSSION**

No individuals in the stage VGI 0 were found during the period of conditioning, whereas individuals in stages VGI 1, 2, and 3 were present throughout all the year. In addition, the histological study showed that stages VGI 1, 2 and 3 had simultaneously early, pre-mature and fully mature oocytes, although in different proportions. Therefore, it seems that under culture conditions, the reproduction of *Haliotis tuberculata coccinea* was continuous throughout the entire year (i.e. there was not a reproductive rest) and the ovary developed by synchronous groups. These results are consistent with those found by Bilbao *et al.* (2010a) for the same species in a natural population. Likewise, under culture conditions, *Haliotis tuberculata coccinea* responded to temperature variations and a higher percentage of individuals in stages VGI 2 and 3 was found between May and January, the period when the maximum water temperatures were recorded. Under culture conditions, the highest reproductive activity occurred three months earlier than in natural populations (Bilbao *et al.*, 2010a) and it may be due to a higher food availability for the broodstock observed in the present study. In fact, temperature and food availability seem to be the major factors affecting reproduction in different abalone species (Uki and Kikuchi, 1984; Hahn, 1989; Grubert and Ritar, 2005). Forty percent of induced females and 70.6% of induced males spawned more than once a year, suggesting that *Haliotis tuberculata coccinea* is a partial-spawning species as others tropical and warm water species such as *Haliotis asinina* and *Haliotis discus hannai* (Jebreen *et al.*, 2000; Fukazawa *et al.*, 2007). Fukuzawa *et al.* (2007) found in *Haliotis discus hannai* that the mature oocyte cohort could be released in several natural spawning events within a period around a month (with a constant conditioning temperature of 20 °C) before they are absorbed by the ovary and, the second oocyte cohort starts to develop after the first oocyte cohort disappears from the ovary. The time required to complete the oogenesis varies among the different abalone species and the culture conditions (i.e., temperature and conditioning period). Jebreen *et al.* (2000) show that the period of time necessary to complete the oogenesis in the tropical species *Haliotis asinina* is around one month and this species is capable to develop at least 3 cohorts of oocytes per year, without

changing the water temperature. Fukuzawa *et al.* (2007) show that the oogenesis in *Haliotis discus hannai* (warm water species) is completed within a term of one month and this species is capable to develop at least 2 cohorts of oocytes per year with a broodstock conditioning at 20 °C. Likewise, the time required to complete oogenesis in *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata* (a warm water species) is around three months with a broodstock conditioning at 16 °C (Grubert and Ritar, 2005). Although the present study was not designed to determine the time required to complete the oogenesis in *Haliotis tuberculata coccinea* (i.e., no histological study of the gonad during conditioning period was performed), the specimens which responded to the spawning induction required between 2 and 4 months to respond again to the stimulus without changing the conditioning temperature.

The broodstock used in this study came from a natural population and not all the individuals responded satisfactorily to the culture conditions. This fact is reflected in the number of specimens which did not reach stage VGI 3 during the study period (24 females and 15 males). In the present study, the broodstock conditioning was not performed individually. Thus, it is unknown whether all the animals ate the same amount of diet and the manner this fact affects the gonad maturation. However, all the animals had the same opportunity to be fed to satiation, since leftover food was found every week in the conditioning tanks. Therefore, it seems that the genetic profile of some individuals could result in a better adaptation to the culture conditions. This fact underlines the importance of the broodstock selection in order to ensure the conditioning success in an abalone hatchery.

According to our findings, the right time to induce spawning in *Haliotis tuberculata coccinea* is when females have reached stage VGI 3, since the ovary has a significantly higher ( $P < 0.05$ ) amount of mature oocytes ( $52.93 \pm 15.6$  %) during this stage. Furthermore, it was also found that the ovary size was bigger during this stage (i.e., the area in the base of the conical appendage). However, the stage VGI 3 did not ensure the spawning induction success in *Haliotis tuberculata coccinea*, according to the results founded by Freeman *et al.* (2006) in *Haliotis laevigata*. The response rate of the spawning induction by the hydrogen peroxide method was lower than 100% founded by Peña (1986) in *Haliotis tuberculata coccinea*. In the experiment carried out by Peña (1986), the number of individuals was lower than those used in the present study (5 females and 5 males). Out of the total broodstock induced to spawn,  $19.3 \pm 10.3$  % of females and  $30 \pm 14.6$  % of males responded successfully and spawning events were obtained. In the reviewed bibliography, the spawning rate varies between 4 and 100 % according to the different abalone species, the period and/or the temperature of the conditioning and the spawning induction method used (Leonart, 1992; Moss *et al.*, 1995; Moss, 1998; McCormick and Brogan, 2003; Grubert and Ritar, 2005). Moss (1998) suggested that the stress caused during the

collection of the broodstock from a natural population may cause a gamete resorption and this fact may explain why it is difficult to induce spawning in *Haliotis australis* soon after the individuals are collected. However, he did not find good spawning rates after a 14-week broodstock conditioning at a constant temperature of 18 °C (an average of 17 % for males and 10 % in females). In a previous study, Moss *et al.* (1995) also found low spawning rates in a broodstock batch of *Haliotis iris*, captured in a natural population and induced to spawn by the hydrogen peroxide method (15 % of females and 43 % of males). Despite the large number of females induced to spawn during this trial, no relationship was found between the number of eggs released and the animal size (i.e., shell length). Similar observations have been reported in other abalone species induced to spawn (Babcock and Keesing, 1999; Grubert and Ritar, 2005). On the contrary, Peña (1986) observed an exponential relationship between the number of eggs released and the shell length in *Haliotis tuberculata coccinea*. The results obtained in this experiment (i.e., low spawning rates and absence of a relationship between the fecundity rate and the animal size) may be due in part to the fact that the broodstock came from the natural environment and did not adapt well to the conditioning or to the induction method either and, on the other hand, to the generated stress in the animals related to the spawning induction tasks, which were performed on a monthly basis (i.e., the induced animals which did not respond satisfactorily to the spawning induction lost weight), or to a combination of both reasons. The animals which spawned required between 2 and 4 months to be able to successfully respond again to the spawning induction. By making longer intervals between spawning induction operations (spawning inductions not performed on a monthly basis), on the one hand, it would entail a lower manipulation of the broodstock and would avoid stress, and on the other hand, the broodstock would have more time to produce a higher amount of mature oocytes. In this case, it may be possible for the broodstock in stage VGI 3 to better respond to the spawning induction.

In the fertilization trial, by increasing the sperm concentrations, the fertilization success increased rapidly until 90 % with  $10^5$  spermatozooids / ml. With higher sperm concentrations, the fertilization success rapidly declined. In the reviewed bibliography, the sperm concentrations necessary for the maximum fertilization rates vary among different abalone species and not all the studies reached 100 % fertilization rates (Babcock and Keesing, 1999; Baker and Tyler, 2001). In *Haliotis discus hannai*, 100% of fertilization rate was obtained with  $10^5$  spermatozooids / ml (Kikuchi and Uki, 1974c). In *Haliotis tuberculata* fertilization rates between 90 and 100 % are obtained within a range of  $5 \times 10^4$  and  $10^6$  spermatozooids / ml (Clavier, 1992b; Baker and Tyler, 2001). The sperm concentrations between  $5 \times 10^3$  and  $10^5$  spermatozooids / ml have been described as optimal in *Haliotis rubra* (Huchette *et al.*, 2004). Leighton and Lewis (1982) studied

the optimal concentration and the subsequent normal development of embryo and larvae and concluded that, for *Haliotis rufescens*, *Haliotis corrugata*, *Haliotis fulgens* and *Haliotis sorenseni*, the optimal concentration is  $10^6$  spermatozooids / ml. In *Haliotis asinina* the maximum fertilization rate and a normal embryonic development is within a lower order of concentration ( $10^5$  spermatozooids / ml), according to the results obtained by Encena *et al.* (1998). More recently, Luo *et al.* (2010) showed that the hybridization of the species *Haliotis gigantea* and *Haliotis discus hannai* requires a concentration of  $10^7$  spermatozooids / ml, with which they obtained the maximum fertilization rate and the highest percentage of normal larval development. In the present study, considering the results of the percentage of normal larvae development, it seems that the optimal sperm concentration for the fertilization of *Haliotis tuberculata coccinea* is  $10^4$  spermatozooids / ml. As found in other studies (Encena *et al.*, 1998; Baker and Tyler, 2001), the results obtained in this experiment suggest that the abnormal larval development is a consequence of polyspermy as, by increasing the sperm concentration, the percentage of normal larvae decreases. In fact, in the present trial, the dissolution of the egg membrane was observed with a concentration over  $10^6$  spermatozooids / ml. In other species (i.e. *Haliotis rubra* and *Haliotis tuberculata*), the dissolution of the egg membrane was observed with a concentration over  $10^7$  spermatozooids / ml (Clavier, 1992b; Baker and Tyler, 2001; Huchette *et al.*, 2004). Polyspermy may occur during the finite time delay between initial egg fertilization and any polyspermy block activation and this event is increasingly likely as sperm suspensions are more concentrated (Styan, 1988). Blocks to polyspermy are common to many taxa (Togo *et al.*, 1995), but it remains unresolved which anti-polyspermy mechanisms occur in abalone species (Baker and Tyler, 2001).

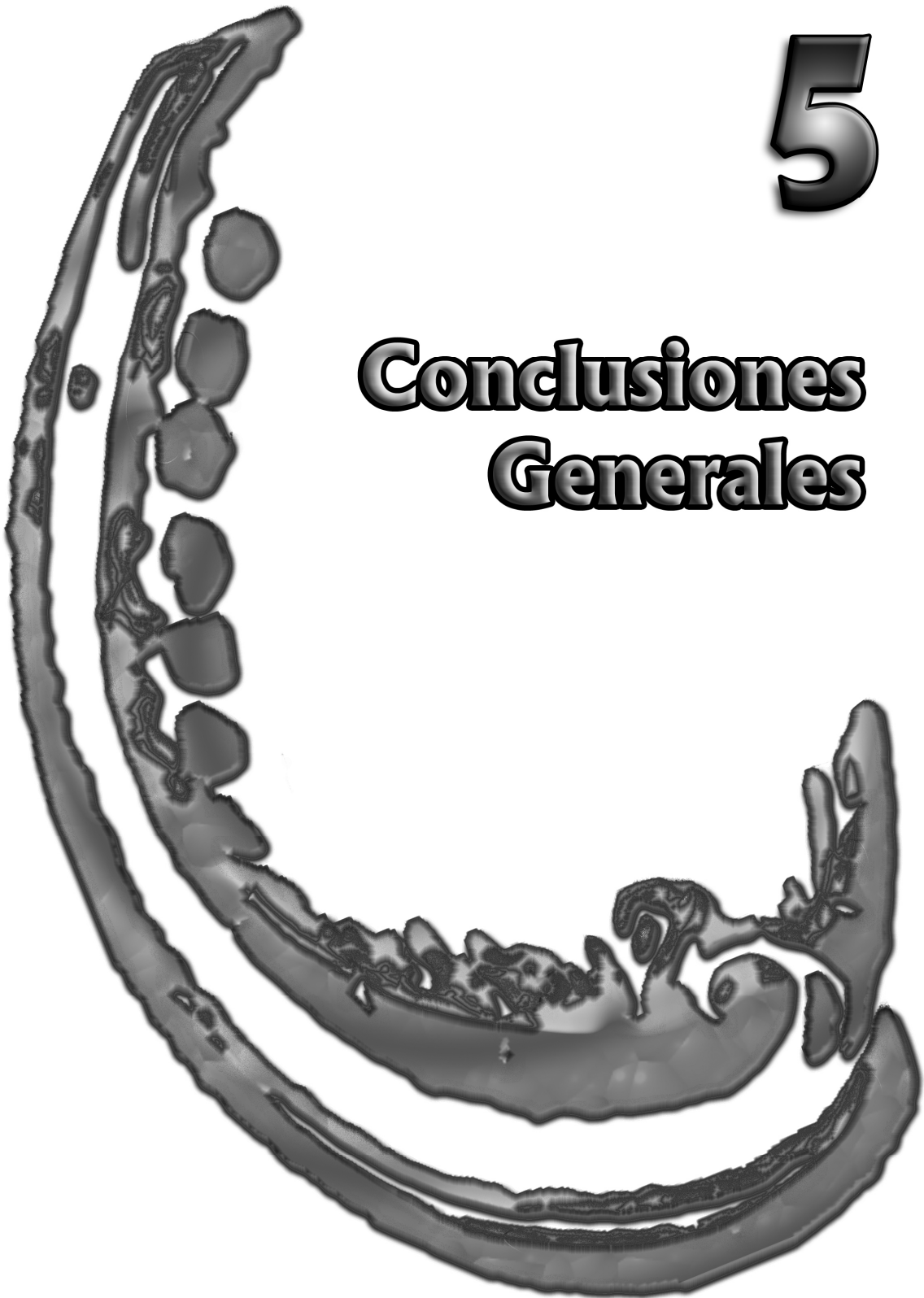
In the present study, with low sperm concentrations, low fertilization rates were obtained, according with the results founded by Baker and Tyler (2001) in *Haliotis tuberculata*, these authors suggest that this fact is a result of the decreased probability of successful egg-sperm encounters. Apart from the sperm concentration used in the fertilization tasks, some studies showed that the age of gametes is also important and it is recommended that the semen used is not older than 30 minutes of age after it was released (Baker and Tyler, 2001) and that the eggs should not be older than 2 hours of age after they were released in *Haliotis asinina*, *Haliotis laevigata* and *Haliotis tuberculata* (Encena *et al.*, 1998; Babcock and Keesing, 1999; Baker and Tyler, 2001). However, it seems that the contact time between gametes does not significantly affect the percentage of fertilization of *Haliotis rufescens* and *Haliotis tuberculata* and a contact time between 15 and 30 minutes is recommended for these species (Elbert and Houk, 1984; Babcock and Keesing, 1999).

In conclusion, this study showed that it is possible to obtain induced spawnings by the hydrogen peroxide method all the year round by conditioning *Haliotis tuberculata coccinea* broodstock using a mixed diet and without changing the water temperature. However, the results showed that not all the individuals used in this study (captured in the natural environment) had the same response to culture conditions or to the spawning induction either. Thus, it is important to keep a log of specimens which respond satisfactorily to the spawning induction and to select them in order to minimize the work and costs involved in the conditioning tasks in the hatchery. Likewise, the results suggested that in a hatchery (where the release of large number of eggs is expected using a spawning induction) inducing spawning on a monthly basis is not very suitable. The fertilization trial showed that, in *Haliotis tuberculata coccinea*, the optimal sperm concentration necessary to obtain good fertilization rates and a good percentage of normal larval development occurred with  $10^4$  spermatozoids / ml.



# 5

## Conclusiones Generales





## CONCLUSIONES

1. La reproducción de *Haliotis tuberculata coccinea* en la naturaleza se extendió a todo el año, aunque se observó una mayor actividad reproductora entre agosto y febrero, coincidiendo con las mayores temperaturas del agua.
2. El ovario de *Haliotis tuberculata coccinea* se desarrolló por grupos sincrónicos, es decir, en un ovario maduro se encontraron dos grupos de oocitos, uno de mayor tamaño que es expulsado en el acto de puesta y otro de menor tamaño que se desarrolla cuando ha sido expulsado y/o absorbido por el ovario, el de mayor tamaño.
3. Las hembras superiores a 55 mm en longitud de concha, provenientes de una población natural, contuvieron un número significativamente superior de huevos en las gónadas maduras. Este hecho sugiere el acondicionamiento de hembras de una talla igual o superior a 55 mm.
4. Dependiendo de la cantidad de fertilizante (amonio y fosfato), utilizado en el cultivo de la macroalga *Gracilaria cornea*, su composición proximal varió. Se logró un porcentaje de aproximadamente un 30 % de proteína con la adición de 33,3 mg / l d de amonio y 3,3 mg / l d de fosfato al cultivo.
5. La utilización del alimento *Gracilaria cornea*, con un alto contenido en proteína (aproximadamente un 30 %) favoreció el crecimiento (en términos de longitud de concha y ganancia en peso) de hembras reproductoras de *Haliotis tuberculata coccinea*. Así mismo, aumentó la fecundidad relativa (mayor número de huevos por gramo de animal), y tanto el diámetro del huevo como del citoplasma del huevo fueron significativamente más grandes. Se observó además, que bajo este régimen de alimentación, el ovario maduro de *Haliotis tuberculata coccinea* contuvo un mayor contenido de ácido Araquidónico.
6. El uso de aceite de clavo como anestésico en ejemplares adultos de *Haliotis tuberculata coccinea*, fue adecuado a una concentración de 0,5 ml / l, disuelto previamente al 50% en alcohol absoluto.
7. La especie de poliqueto, que afectó al cultivo de *Haliotis tuberculata coccinea* en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas fue *Polydora hoplura*.
8. La utilización de baños múltiples de mebendazol (3 baños en tres días consecutivos cada mes, durante 7 meses), en una concentración de 120 mg / l, erradicó la infestación de *Polydora hoplura* en *Haliotis tuberculata coccinea*.

9. El ciclo reproductivo en cautividad de *Haliotis tuberculata coccinea*, se extendió a lo largo de todo el año con una alimentación basada en una mezcla de las macroalgas *Ulva rígida* y *Gracilaria cornea*, sin modificar la temperatura del agua y se observó una mayor actividad reproductiva entre mayo y enero.
10. No todos los reproductores de *Haliotis tuberculata coccinea*, capturados en el medio natural, y estabulados en el Instituto Canario de Ciencias Marinas respondieron satisfactoriamente a las condiciones de cultivo, ni a la inducción al desove.
11. Los reproductores de *Haliotis tuberculata coccinea* acondicionados con una dieta mixta de macroalgas *Ulva rígida* y *Gracilaria cornea*, y sin modificar la temperatura del agua, requirieron entre dos y cuatro meses para volver a responder a la inducción a la puesta.
12. La utilización de una concentración de  $10^4$  espermatozoides / ml, en la fertilización, fue la adecuada para obtener la mejor tasa de fertilización, y un alto porcentaje de desarrollo larvario normal.



# 6

## Referencias Bibliográficas Generales



## A

- Alcantara, L. y T. Noro. 2006. Growth of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve) fed with macroalgae in floating net cage and plastic tank. *Aquaculture Research* 37 (7): 708 – 717.
- Anónimo. 2011. [www.google.com](http://www.google.com)
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA. 1018 pp.
- Apisawetakan, S., V. Linthong, C. Wanichanon, S. Panasophonkul, A. Meepool, M. Kruatrachue, E.S. Upatham, T. Pumthong y P. Sobhon. 2001. Ultrastructure of female germ cells in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Invertebrate Reproduction and Development* 39: 67 – 79.
- APROMAR. 2011. La Acuicultura Marina de peces en España. [www.apomar.es](http://www.apomar.es). 76 pp.
- Aquilina, B. y R. Roberts. 2000. A method for inducing muscle relaxation in the abalone, *Haliotis iris*. *Aquaculture* 190: 403 – 408.
- Armstrong, D.A., J.L. Armstrong, S.M. Krassner y G.B. Pauley. 1971. Experimental wound repair in the black abalone, *Haliotis cracherodii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 17: 216 – 227.
- Ault, J.S. 1985. Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of World Mariculture Society* 16: 398 – 425.
- Awaji, M. y K. Hamano. 2004. Gonad formation, sex differentiation and gonad maturation processes in artificially produced juveniles of the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture* 239: 397 – 411.

## B

- Babcock, R. y J. Keesing. 1999. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevigata*. Laboratory and field studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 56: 1668 – 1678.
- Baker, M.C. y P.A. Tyler. 2001. Fertilization success in the commercial gastropod *Haliotis tuberculata*. *Marine Ecology Progress Series* 211: 205 – 213.
- Barger, I. A. 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal of Parasitology* 29: 41 – 47.
- Barkai, R. y C.L. Griffiths. 1986. Diet of South African abalone *Haliotis midae*. *South African Journal of Marine Science* 4: 37 – 44.
- Bautista-Teruel, M.N. y O.M. Millamena. 1999. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asinina*. protein/energy levels. *Aquaculture* 178: 117–126.

- Bautista-Teruel, M.N., O.M. Millamena y A.C. Fermin. 2001. Reproductive performance of hatchery-bred donkey's ear abalone, *Haliotis asinina*, Linne, fed natural and artificial diets. *Aquaculture Research* 32: 249 – 254.
- Bell, J.G. y J.R. Sargent. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218 (1-4): 491 – 499.
- Bell, J.G., D.R. Tocher, F.M. Macdonald y J.R. Sargent. 1994. Effects of diets rich in linoleic (18:2n-6) and alpha-linolenic (18:3n-3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 13 (2): 105 – 118.
- Berthou, P., J.P. Beurier, D. Buestel y J. Clavier. 1985. Etat actuel des connaissances sur les stocks naturels d'ormeux: Elements halieutiques et juridiques. *Pêche Maritime* 64: 288 – 294.
- Bilbao, A., V. Tuset, M.P. Viera, G. Courtois de Vico, H. Fernández-Palacios, R. Haroun y M.S. Izquierdo. 2010a. Reproduction, fecundity and growth of abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve 1846) in the Canary Islands. *Journal of Shellfish Research* 29 (4): 959 – 967.
- Bilbao, A., G. Courtois De Vico, M.P. Viera, B. Sosa, H. Fernández-Palacios y C.M. Hernández-Cruz. 2010 b. Efficiency of clove oil as anesthetic for abalone (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve). *Journal of Shellfish Research* 29 (3): 679-682.
- Bilbao, A., J. Nuñez, M.P. Viera, B. Sosa, H. Fernández-Palacios y C.M. Hernández-Cruz. 2011. Control of Shell-boring polychaetes in *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve 1846) aquaculture: species identification and effectiveness of mebendazole. *Journal of Shellfish Research* 30 (2): 331-336.
- Blake, J.A. y J.W. Evans. 1973. Polydora and related genera as borers in mollusk shells and others calcareous substrates. *Veliger* 15: 235 – 249.
- BOC (Boletín Oficial de Canarias), 2001/097, Miércoles 1 de agosto de 2001- 01107. Real Decreto 151/2001, de 23 de julio, por el que se elabora el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente).
- BOE (Boletín Oficial del Estado), 2011/043, Miércoles 23 de febrero de 2011-20912. Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino).

- Bolton, J.J., D.V. Robertson-Andersson, D. Shuuluka y L. Kandjengo. 2009. Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *Journal of Applied Phycology* 21: 575 – 583.
- Booolootian, R. A., A. Farmanfarmaian y A. C. Giese. 1962. On the reproductive cycle and breeding of two western species of *Haliotis*. *The Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory* 122: 183–193.
- Bower, S.M. 2003. Update on emerging abalone diseases and techniques for health assessment. *Journal of Shellfish Research* 22 (3): 805 – 810.
- Buchmann, K. 1993. Epidemiology and control of *Pseudodactylogyryrus* infections in intensive eel culture systems: recent trends. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 328: 66 – 73.
- Buchmann, K. y J. Bjerregaard. 1990. Mebendazole treatment of *Pseudodactylogyryrosis* in an intensive eel-culture system. *Aquaculture* 86: 139 – 153.
- Buchmann, K., A. Roepstorff y P. J. Waller. 1992. Experimental selection of mebendazole resistant gill monogeneans from European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of Fish Disease* 15: 393 – 400.
- Bussarawit, S., P. Kawintertwathana y A. Nateewathana. 1990. Preliminary study on reproductive biology of the abalone *Haliotis varia* at Phuket, Andaman Sea Coast of Thailand. Kasetsart. *Journal of Natural Science* 24: 529 – 539.

## C

- Cai, L., y C. D. Wu. 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products* 59: 987–990.
- Campbell, A., J. Lessard y G.S. Jamieson. 2003. Fecundity and seasonal reproduction of northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*, in Barkley Sound, Canada. *Journal of Shellfish Research* 22 (3): 811 – 818.
- Cañete, R., A. A. Escobedo, P. Almirall, M. E. González, K. Brito y S. Cimerman. 2009. Mebendazole in parasitic infections other than those caused by soil-transmitted helminths. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 437 – 442.
- Capinpin, E.C., V.C. Encena y C.B. Bayona. 1998. Studies on the reproductive biology of the Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linné. *Aquaculture* 166: 141 – 150.
- Chanpoo, M., S. Apisewatakan, C. Thongkukiatkul, C. Wanichanon, V. Linthong, M. Kruatrachue, E. Upathan, T. Pumthong, P. Hanna y P. Sobhon. 2001. Localization of egg-laying

- hormone in the gonads of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research* 20 (2): 725 – 731.
- Chiou, T.K., M.M. Lai y C.Y. Shiau. 2001. Seasonal variations of chemical constituents in the muscle and viscera of small abalone fed different diets. *Fisheries Science* 67: 146 – 156.
- Cho, C.Y., S.J. Slinger y H.S. Bayley. 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 73: 25 – 41.
- Cho, G. K. y D. D. Heath. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS-222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* 31: 537 – 546.
- Christie, W.W. 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press, editor, Oxford. (Second revised edition) 207 pp.
- Clavier, J. 1992a. Infestation of *Haliotis tuberculata* shells by *Cliona celata* and *Polydora* species. In: S.A. Guzman del Proo, M.J. Tegner and S.A. Shepherd, editors. Abalone of the World. Adelaide: Fishing News Books. pp 16 – 20.
- Clavier, J. 1992b. Fecundity and optimal sperm density for fertilization in the ormer (*Haliotis tuberculata* L.). In: S.A. Guzman del Proo, M.J. Tegner and S.A. Shepherd, editors. Abalone of the World. Adelaide: Fishing News Books. pp.86 – 92.
- Clavier, J. y O. Richard. 1986. Growth of juvenile *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Gastropoda) in their natural environment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66: 497 – 503.
- Clavier, J. y P. Chardy. 1989. Investigation into the ecology of the ormer (*Haliotis tuberculata*), factors influencing spatial distribution. *Aquatic Living Resource* 2 (4): 191 – 197.
- Cohen I. y A. Neori. 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishponds effluents. I. Ammonia uptake kinetics and Nitrogen content. *Botanica Marina* 34: 475 – 482.
- Cochard, J.C., 1980. Recherches sur les facteurs determinant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata* L. Thesis, University of Western Brittany. 162pp.
- Cook, E.J. y M.S. Kelly. 2007. Effect of variation in the protein value of the red macroalga *Palmaria palmata* on the feeding, growth and gonad composition of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquaculture* 270: 207 – 217.



- Cook, E.J., A.D. Hughes, H. Orr, M.S. Kelly y K.D. Black. 2007. Influence of dietary protein on essential fatty acids in the gonadal tissue of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquaculture* 273 (4): 586 – 594.
- Cook, P.A. y H. R. Gordon. 2010. World abalone supply, markets, and pricing. *Journal of Shellfish Research* 29 (3): 569 – 571.
- Coote, T.A., P.W. Hone, R.J. Van Barneveld y G.B. Maguire. 2000. Optimal protein level in a semipurified diet for juvenile greenlip abalone *Haliotis laevigata*. *Aquaculture Nutrition* 6 (4): 213 – 220.
- Counihan, R.T., D.C. McNamara, D.C. Souter, E.J. Jebreen, N.P. Preston, C.R. Johnson y B.M. Degnan. 2001. Pattern, synchrony and predictability of spawning in the tropical abalone *Haliotis asinina* from Heron Reef, Australia. *Marine Ecology Progress Series* 213: 193 – 202.
- Courtois de Vicose, G., M.P. Viera, A. Bilbao y M.S. Izquierdo. 2007. Embryonic and larval development of *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve: an indexed microphotographic sequence. *Journal of Shellfish Research* 26 (3): 847 – 854.
- Courtois de Vicose, G., M.P. Viera, A. Bilbao y M.S. Izquierdo. 2010. Larval settlement of *Haliotis tuberculata coccinea* in response to different inductive cues and the effect of larval density on settlement, early growth, and survival. *Journal of Shellfish Research* 29 (3): 587 – 591.
- Courtois de Vicose, G. 2011. Early life of the abalone *Haliotis tuberculata coccinea*: development, settlement and growth. Tesis doctoral, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España. 224 pp.
- Cox, K. 1962. California abalones, family Haliotidae. *The Californian Department of Fish and Game* 118: 1 – 133.
- Cózar-Bernal, M. J., V. Gallardo, E. Sáez-Fernández, M. A. Holgado, J.Álvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo y J. L. Arias. 2010. Role of the electrokinetic properties on the stability of mebendazole suspensions for veterinary applications. *International Journal of Pharmacology* 393:161–166.
- Crofts, D.R. 1929. Haliotis. *Liverpool Marine Biology Community. Memoirs on Typical British Marine Plants and Animals* 29: 174 pp.

## D

- Daume, S. 2007. Improvement and evaluation of greenlip abalone hatchery and nursery production. Final report to Fisheries Research and Development Corporation on Project No. 2003/203. Fisheries Research Contract Report No. 16, Department of Fisheries, Western Australia. 160 pp.
- Daume, S. y S. Ryan. 2004. Fatty acid composition of eggs derived from conditioned and wild caught greenlip abalone broodstock (*Haliotis laevigata*). *Journal of Shellfish Research* 23(4): 967– 974.
- Daume, S., A. Krsinich, S. Farrell y M. Gervis. 2000. Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *Journal of Applied Physiology* 12: 479 – 488.
- Daume, S., S. Huchette, S. Ryan y R. W. Day. 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: the effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile production. *Aquaculture* 236: 221 – 239.
- Day, R. W. y A. E. Fleming. 1992. The determinants and measurement of abalone growth. In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. *Abalone of the world*. Adelaide: Fishing News Books. pp. 141–167.
- Dayan, A. D. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel: review of nonclinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropical* 86: 141 – 159.
- Demetropoulos, C.L. y C.J. Langdon. 2004. Effects of nutrient enrichment and biochemical composition of diets of *Palmaria mollis* on growth and condition of Japanese abalone, *Haliotis discus hannai* and red abalone, *Haliotis rufescens*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 308: 185 – 206.
- De Villiers, M. M., R. J. Terblanche, W. Liebenberg, E. Swanepoel, T. G. Dekker y M. Song. 2005. Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38: 435 –441.
- Diggles, B.K., J. Nichol, P.M. Hine, S. Wakefield, N. Cochennec-Laureau, R.D. Robens y C.S. Friedman. 2002. Pathology of cultured paua *Haliotis iris* infected with a novel haplosporidian parasite, with some observations on the course of disease. *Disease of Aquatic Organisms* 50: 219 – 231.

Dixon, M.G., T. Hecht y C.R. Brandt. 1991. Identification and treatment of a *Clostridium* and *Vibrio* infection in South African abalone *Haliotis midae* L. *Journal of Fish Diseases* 14: 693 – 695.

Dunstan, G.A., H.J. Baillie, S.M. Barrett y J.K. Volkman. 1996. Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture* 140: 115 – 127.

## E

Elbert, E.E. y J.L. Houk. 1984. Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 39: 375 – 392.

Encena, V.C., J. Capinpin y N.C. Bayona. 1998. Optimal sperm concentration and time for fertilization of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné 1758. *Aquaculture* 165: 347 – 352.

Endo, T., K. Ogishima, H. Tanaka y S. Ohshima. 1972. Studies on the effect of eugenol in some fresh water fishes. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 38: 761 – 767.

Espino, F. y R. Herrera. 2002. Seguimiento de poblaciones de especies amenazadas 2002 (*Haliotis tuberculata coccinea*, Nordsieck, 1975) Gran Canaria. Informe final presentado por Gesplan y la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente (Viceconsejería de Medio Ambiente de Gran Canaria y Dirección General de Política Ambiental). Informe no publicado. 52pp.

## F

Fallu, R. 1991. Abalone farming. Fallu, R. Oxford. Fishing New Books. 202 pp.

FAO, 1990. Training Manual on Artificial Breeding of Abalone (*Haliotis discus hannai*) in Korea DPR. Technical Review nº 7. <http://www.fao.org>. 81 pp.

FAO, 1995. Synopsis of biological data on the european abalone (ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae). Fisheries Synopsis No. 156 FIR/S156. <http://www.fao.org>. 27 pp.

FAO, 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO producción y sanidad animal 157. Rome: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. <http://www.fao.org>. 51 pp.

FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. ISBN 978-92-5-306675-9. <http://www.fao.org>. 242pp.

- FAO, 2011. Fisheries statistic and aquaculture. Global aquaculture production 1950-2008. <http://www.fao.org/figis>. Accessed April 2011.
- Farías, A. y I. Uriarte. 2001. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Arcopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Shellfish Research* 20(1): 97 – 105.
- Fisheries y Oceans, 2002. National Recovery Plan for Northern Abalone of British Columbia, Canada. [www.island.net/abaloneproject/Abalone%20Survey%20Report%Final.pdf](http://www.island.net/abaloneproject/Abalone%20Survey%20Report%Final.pdf). 31 pp.
- Fishtech, 2008. <http://www.fishtech.com/facts.html>. Accessed April 2011.
- Fleming, A. 2001. Conditioning Australian abalone broodstock. Best practice manual. A report for the Marine and Freshwater Research Institute, Queenscliff. 40 pp.
- Floreto, E.A.T., S. Teshima y S. Koshio. 1996. The effects of seaweed diets on the lipid and fatty acids of the Japanese disc abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Science* 62: 582 – 588.
- Folch, J., M. Lees y G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497 – 509.
- Foster, G.R. 1967. The growth of *Haliotis tuberculata*: results of tagging experiments in Guernsey. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 62: 717 – 727.
- Francis, T.L., G.W. Maneveldt y J. Venter. 2008. Growth of market-size abalone (*Haliotis midae*) fed kelp (*Ecklonia maxima*) versus a low-protein commercial feed. *African Journal of Aquatic Science* 33(3): 279 – 282.
- Freeman, K., S. Daume, M. Rowe, G. Maguire, S. Parsons y R. Lambert. 2006. A broodstock conditioning trial with greenlip abalone (*Haliotis laevigata* Donovan) in Western Australia. *Journal of Shellfish Research* 25(1): 187 – 194.
- Friedman, C.S., M. Thomson, C. Chun, P.L. Haaker y R.P. Hedrick. 1997. Withering syndrome of black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *Journal of Shellfish Research* 16 (2): 403 – 411.
- Friedman, C.S., K.B. Andree, K.A. Beauchamp, J.D. Moore, T.T. Robbins, J.D. Shields y R.P. Hedrick. 2000. *Candidatus Xenohaliotis californiensis* a newly described pathogen of abalone, *Haliotis spp.*, along the west coast of North America. *International Journal of Systematic Bacteriology* 50 (2): 847 – 855.

Friedman, C.S., G. Trevelyan, T.T. Rohbins, E.P. Mulder y R. Fields. 2003. Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 224: 1 – 23.

Fukazawa, H., T. Kawamura, H. Takami y Y. Watanabe. 2007. Oogenesis and relevant changes in egg quality of abalone *Haliotis discus hannai* during a single spawning season. *Aquaculture* 270: 265 – 275.

Fundación Copec, 2005. Adaptación Tecnológica y Producción de Medias Perlas Mabe de alta Pureza en Abalón *Haliotis rufescens* en Chile. Informe final del Proyecto PC-0020. Fundación Copec UC y la Universidad de Los Lagos, Puerto Montt, Chile. 145 pp.

## G

Gayanilo, F. C. Jr. and D. Pauly. 1997. The FAO-ICLARM Stock Assessment Tool (FISAT). Reference manual. FAO computerized information series (fisheries), no. 8. Rome: FAO. 262 pp.

Geary, T. G., D. P. Thompson y R. D. Klein. 1999. Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *International Journal of Parasitology* 29: 105 – 112.

Geiger, D. 2000. Distribution and Biogeography of the recent Haliotidae World Wide. *Bollettino Malacologico* 35: 57 – 188.

Genade, A.B., A.L. Hirts y C.J. Smit. 1988. Observations on the spawning, development and rearing of the South African abalone, *Haliotis midae*. *South African Journal of Marine Science* 6: 3 – 12.

Girard, A. 1972. La reproduction de l'ormeau, *Haliotis tuberculata* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes*. 36 (2): 163 – 184.

Gómez-Montes, L., Z. García-Esquivel, L.R. D'Abramo, A. Shimada, C. Vásquez-Peláez y M.T. Viana. 2003. Effect of dietary protein: energy ratio on intake, growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture* 220 (1-4): 769 – 780.

González, J.L. y J.A. Malo de Molina. 2002. Viabilidad del cultivo de oreja de mar en las costas gallegas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, editores. ISBN: 84-491-0670-2, Madrid, España. 171 pp.

Gordon, H.R. y P.A. Cook. 2001. World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future. *Journal of Shellfish Research* 20 (2): 567 – 570.

Goven, B. A. y D. F. Amend. 1982. Mebendazole/trichlorfon combination: a new anthelmintic for removing monogenetic trematodes from fish. *Journal of Fish Biology* 20: 373 – 378.

- Graham, F., T. Mackrill, M. Davidson y S. Daume. 2006. Influence of conditioning diet and spawning frequency on variation in egg diameter for greenlip abalone, *Haliotis laevis*. *Journal of Shellfish Research* 25 (1): 195 – 200.
- Gray, M. 2003. Morphometrics and reproduction of *Terebrasabella heterouncinata* (Polychaeta: Sabellidae), infesting abalone (*Haliotis midae*) from different culture environments. PhD thesis, Rhodes University, South Africa. 156 pp.
- Grubert, M.A. y A.J. Ritar. 2002. Abalone broodstock conditioning system at TAFI MRL. Austasia. *Aquaculture* 16(3): 29 – 36.
- Grubert, M.A. y A.J. Ritar. 2004. Temperature effects on the dynamics of gonad and oocyte development in captive wild-caught blacklip (*Haliotis rubra*) and greenlip (*H. laevis*) abalone. *Invertebrate Reproduction and Development* 45 (3): 185 -196.
- Grubert, M.A. y A.J. Ritar. 2005. The effect of temperature and conditioning interval on the spawning success of wild-caught blacklip (*Haliotis rubra*, Leach 1814) and greenlip (*H. laevis*, Donovan 1808) abalone. *Aquaculture Research* 36: 654 – 665.
- Grubert, M.A., G.A. Dunstan y A.J. Ritar. 2004. Lipid and fatty acid composition of pre- and post-spawning blacklip (*Haliotis rubra*) and greenlip (*Haliotis laevis*) abalone conditioned at two temperatures on a formulated feed. *Aquaculture* 242: 297 – 311.

## H

- Haaker, P.L., D.O. Parker, H. Togstad, D.V. Richards, G.E. Davis y C.S. Friedman. 1992. Mass mortality and withering syndrome in black abalone, *Haliotis cacherodii*, in California. In: Guzman del Proo, S.A., Tegner, M.J., Shepherd, S.A. (Eds.), *Abalone of the World*. Fish. Rep. Dep. Fish. 24, Adelaide (Australia): 214 – 224.
- Handley, S. J. 1998. Power to the oyster: do spionid-induced shell blisters affect condition in subtidal oysters? *Journal of Shellfish Research* 17: 1093 – 1099.
- Hanh, K.O. 1989. Handbook of culture of abalone and other gastropods. K.O. Hanh, editor. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. pp 348.
- Hanh, K.O. 1992. Review of endocrine regulation of reproduction in abalone *Haliotis spp.* In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. *Abalone of the World*. Adelaide: Fishing News Books. 49 – 56.
- Hanh, K.O. 1994. Gametogenic cycle of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, during conditioning with effective accumulative temperature. *Aquaculture* 122: 227 – 236.

- Harris, J.O., G.B. Maguire, S.J. Edwards y S.M. Hindrum. 1997. Effect of nitrite on growth and oxygen consumption for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. *Journal of Shellfish Research* 16 (2): 395 – 401.
- Hayashi, I. 1980a. The reproductive biology of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60: 415 – 430.
- Hayashi, I. 1980b. Structure and growth of a shore population of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60: 431 – 437.
- Hooker, N. y D.N. Morse. 1985. Abalone: the emerging development of commercial cultivation in the United States. In: J.V. Huner and E.E. Brown, editors. Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States. AVI Publisher, Westport, EEUU. pp 413.
- Horiguchi, T., N. Takiguchi, H.S. Cho, M. Kojima, M. Kaya, H. Shiraishi, M. Morita, H. Hirose y M. Shimizu. 2000. Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis mandaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Marine Environmental Research* 50: 223 – 229.
- Horiguchi, T., M. Kojima, M. Kaya, T. Matsuo, H. Shiraishi, M. Morita y Y. Adachi. 2002. Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*. *Marine Environmental Research* 54: 679 – 684.
- Hoskonen, P. y J. Pirhonen. 2004. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. *Journal of Fish Biology* 64: 1136 – 1142.
- Huchette, S.M. y J. Clavier. 2004. Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research* 23 (4): 951 – 955.
- Huchette, S.M.H., J.P. Soulard, C.S. Koh y R.W. Day. 2004. Maternal variability in the backlip abalone, *Haliotis rubra* leach (Mollusca: Gastropoda): effect of egg size on fertilization success. *Aquaculture* 231: 181 – 195.
- Hwang, E.K., J. M. Baek y C.S. Park. 2009. The mass cultivation of *Ecklonia stolonifera* Okamura as a summer feed for the abalone industry in Korea. *Journal of Applied Phycology* 21: 585 – 590.
- I
- Izquierdo, M.S., T. Watanabe, T. Takeuchi, T. Arakawa and C. Kitajima. 1989. Requiriments of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 859 – 867.

## J

JACUMAR. 2009. La acuicultura en España. <http://www.mapa.es>.

Jackson, D., K.C. Williams y B.M. Degnan. 2001. Suitability of Australian formulated diets for aquaculture of the tropical abalone *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research* 20 (2): 627 – 636.

Jebreen, E.J., R.T. Counihan, D.R. Fielder y B.M. Degnan. 2000. Synchronous oogenesis during the semilunar spawning cycle of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Journal of Shellfish Research* 19: 845 – 851.

Jensen, R.A., D.E. Morse, R.L. Petty y N. Hooker. 1990. Artificial induction of larval metamorphosis by free fatty acids. *Marine Ecology Progress Series* 67: 55 – 71.

## K

Kabir, N.M.J., M.F. Barker, P.V. Mladenov y B.E. Niven. 2001. Spawning induction of yellowfoot abalone, *Haliotis australis* using chemicals and ganglionic suspensions. *Journal of Shellfish Research* 20: 667 – 672.

Katharios, P., N. Papandroulakis y P. Divanach. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture* 251: 167 – 171.

Kawamura, T., R.D. Roberts y H. Takami. 1998. A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *Journal of Shellfish Research* 17: 615 – 625.

Keene, J. L., D. L. G. Noakes, R. D. Moccia y C. G. Soto. 1998. The efficacy of clove as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 29: 89 – 101.

Kelly, M. S. y P. V. Owen. 2002. Growth of the abalone *Haliotis tuberculata* L. at Scottish sea temperatures. *Aquaculture Research* 33:729 – 733.

Kikuchi, S. y N. Uki. 1974a. Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis*, II: Effect of irradiated sea water with ultraviolet rays on inducing to spawn. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* (in Japanese with English abstract) 33: 79 – 86.

Kikuchi, S. y N. Uki. 1974b. Technical study of artificial spawning of abalone, genus *Haliotis*, V: Relationship between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis*



*discus* Reeve. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* (in Japanese with English abstract) 34: 77 – 85.

Kikuchi, S. y N. Uki. 1974c. Technical study of artificial spawning of abalone, genus *Haliotis*, III. Reasonable sperm density for fertilization. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* (in Japanese with English abstract) 34: 67 – 71.

Kim, K. H. y E. S. Choi. 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* (monogenea) on the gills of cultured rockfish (*Sebastes schelegelii*) with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture* 167: 115 – 121.

Kim, H. M., E. H. Lee, S. H. Hong, H. J. Song, M. K. Shin, S. H. Kim y T. Y. Shin. 1998. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 60: 125 – 131.

Knauer, J., P.J. Britz y T. Hetch. 1996. Comparative growth performance and digestive enzyme activity of juvenile South African abalone, *Haliotis midae*, fed on diatoms and a practical diet. *Aquaculture* 140: 75 – 85.

Koike, Y. 1978. Biological and ecological studies on the propagation of the ormer, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. I: Larval development and growth of juveniles. *La Mer* 16 (3): 124 – 136.

Krishnaiah, Y. S. R., P. V. Raju, B. D. Kumar, P. Bhaskar y V. Satyanarayana. 2001. Development of colon targeted drug delivery systems for mebendazole. *Journal of Controlled Release* 77: 87 – 95.

Krízová -Forstová, V., J. Lamka, V. Cvilink, V. Hanusová y L. Skálová. 2011. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: the consequences and potential risks. *Research in Veterinary Science* 91: 333 – 341.

Kuris, A.M. y C.S. Culver. 1999. An introduced sabellid polychaete pest of cultures abalone and its potential spread to other California gastropods. *Invertebrate Biology* 118(4): 391 – 403.

Kwang-Geun, L. y T. Shibamoto. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds (*Syzygium aromaticum* L.). *Food Chemistry* 74: 443 – 448.

## L

Laas, A. y A. Vosloo. 2010. Exploring basic biochemical constituents in the body tissues of South African abalone *Haliotis midae* reared in shore-based mariculture systems. *African Journal of Marine Science* 32 (1): 55 – 63.

- Lauckner, G. 1983. Diseases of Mollusca: Bilbavia, agents: Annelida. In: O. Kinne, (Ed.), Diseases of marine Animals, vol. 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp 805 -816.
- Leighton, D.L. 1998. Control of sabellid infestation in green and pink abalones, *Haliotis fulgens* and *H. corrugata*, by exposure to elevated water temperatures. *Journal of Shellfish Research* 17(3): 701 – 705.
- Leighton, D.L. y C.A. Lewis. 1982. Experimental hybridization in abalones. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 5: 273-282.
- Leighton, D. L., M. Byhower, J. C. Kelly, G. N. Hooker y D. E. Morse. 1981. Acceleration of development and growth in young green abalone (*Haliotis fulgens*) using warmed effluent seawater. *The Journal of World Mariculture Society* 12: 170 - 179.
- Lewis, C.L. 1992. Abalone egg vitelline layers and hybrid gamete interactions. In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. Abalone of the world. Adelaide: Fishing News Books: 59 – 75.
- Lleonart, M. 1992. A Gonad Conditioning Study of the Greenlip Abalone (*Haliotis laevigata*). Phd Thesis, University of Tasmania, Hobart. 162 pp.
- Lleonart, M., J. Handlinger y M. Powell. 2003a. Treatment of spionid mud worm (*Boccardia knoxi* Rainer) infestation of cultured abalone. *Aquaculture* 217: 1 – 10.
- Lleonart, M., J. Handlinger y M. Powell. 2003b. Spionid mudworm infestation of farmed abalone (*Haliotis spp.*) *Aquaculture* 221: 85-96.
- Lindberg, D.R. 1992. Evolution distribution and systematics of Haliotidae. In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. Abalone of the world. Adelaide: Fishing News Books: 3-18.
- Li, T., M. Ding, J. Zhang, J. Xiang y R. Liu. 1998. Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal Shellfish Research* 17:707-711.
- Litaay, M. y S.S. DeSilva. 2001. Reproductive performance indices based on physical characteristics of female blacklip abalone *Haliotis rubra* L. *Journal of Shellfish Research* 20 (2): 673 – 677.
- Littay, M. and S. DeSilva. 2003. Spawning season, fecundity and proximate composition of the gonads of wild-caught blacklip abalone (*Haliotis rubra*) from Port Fairy waters, south eastern Australia. *Aquatic Living Resource* 16:353 – 361.

- Litaay, M., S.S. DeSilva y R.M. Gunasekera. 2001. Changes in the amino acid profiles during embryonic development of the balckilp abalone (*Haliotis rubra*). *Aquatic Living Resources* 14 (5): 335 – 342.
- Liu, P., Y. Chen, C. Huang y K. Lee. 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with whitening syndrome. *Letters in Applied Microbiology* 31 (6): 433 – 437.
- Liu, X., F. Wu, H. Zhao, G. Zhang y X. Guo. 2009. A Novel Shell Color Variant of the Pacific Abalone *Haliotis discus hannai* Ino Subject to Genetic Control and Dietary Influence. *Journal of Shellfish Research* 28(2):419-424.
- Luo, X., C. Ke, W. You y D. Wang. 2010. Factors affecting the fertilization success in laboratory hybridization between *Haliotis discus hannai* and *Haliotis gigantea*. *Journal of Shellfish Research* 29(3): 621-625.

## M

- Mackenzie, C. L. y L.W. Shearer. 1959. Chemical control of *Polydora websteri* and other annelids inhabiting oyster shells. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 50: 105 – 111.
- Mai, K., J.P. Mercer y J. Donlon. 1995a. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino: IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture* 136: 165 – 180.
- Mai, K., J.P. Mercer y J. Donlon. 1995b. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino: III. Response of abalone to various levels of dietary lipid. *Aquaculture* 134: 65 – 80.
- Mai, K., J.P. Mercer y J. Dolon. 1996. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino: V. the role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition. *Aquaculture* 139: 77 – 89.
- Martin, G.G., K. Romero y C. Miller-Walker. 1983. Fine structure of the ovary in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *Zoomorphology* 103: 89 – 102.
- Martinez, G., M. Torres, E. Uribe, M. A. Diaz y H. Perez. 1992. Biochemical composition of broodstock and early juvenile Chilean scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck, held in two different environments. *Journal of Shellfish Research* 11: 307 – 313.
- Martini, H., M.Weidenbörner, S. Adams y B. Kunz. 1996. Eugenol and carvacrol: the main fungicidal compounds in clove. *Italian Journal of Food Science* 1:63–67.

- McCormick, T.B. y J. L. Brogan. 2003. Early reproduction in Hatchery-raised white abalone, *Haliotis sorenseni*. *Journal of Shellfish Research* 22 (3): 825 – 829.
- McShane, P.E. 1992. Early life history of abalone: a review. In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. *Abalone of the world*. Adelaide: Fishing News Books: 120 – 138.
- McShane, P.E. y M.G. Smith. 1988. Measuring abundance of juvenile abalone, *Haliotis rubra* Leach (Gastropoda: Haliotidae): Comparison of a novel method with two other methods. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 39: 331 – 336.
- Mellergaard, S. 1990. Mebendazole treatment against *Pseudodactylogyrus* infections in eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 91: 15 – 21.
- Mercer, J.P., K.S. Mai y J. Donlon. 1993. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus and *Haliotis discus hannai* Ino: I. Effects of algal diets on growth and biochemical composition. *Invertebrate Reproduction and Development* 23: 75 – 88.
- Monje, H. y M.T. Viana. 1998. The effect of cellulose on the growth and cellulolytic activity of abalone *Haliotis fulgens* when used as an ingredient in formulated artificial diets. *Journal of Shellfish Research* 17: 657 – 662.
- Moore, P.K. 1985. Prostanoids: pharmacological, physiological and clinical relevance. Cambridge University Press, editor. Cambridge. 263 pp.
- Moore, J.D., T.T. Robbins y C.S. Friedman. 2000. The role of a Rickettsia-like prokaryote in withering syndrome in California red abalone, *Haliotis rufescens*. *Journal of Shellfish Research* 19: 525 – 526.
- Moore, J.D., C.I. Juhasz, T.T. Robbins y E.D. Grosholz. 2007. The introduced sabellid Polychaete *Terebrasabella heterouncinata* in California: transmission, methods of control and survey for presence in native gastropod populations. *Journal of Shellfish Research* 26(3): 869-876.
- Moro, L., J. Martín, M. Garrido e I. Izquierdo. 2003. Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales) 2003. Informe técnico de la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 250 pp.
- Morse, A.N.C. y D.E. Morse. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 75: 191-215.

- Morse, D. E. 1984. Biochemical and genetics engineering for improved production of abalones and other valuable mollusc. *Aquaculture* 39: 263- 273.
- Morse, D.E., H. Duncan, N. Hooker y A. Morse. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science* 196: 298 – 300.
- Morse, D.E., M. Hooker, L. Jensen y H. Duncan. 1979. Induction of larval abalone settling and metamorphosis by aminobutyric acid and its congeners from crustose red algae. 2. Applications to cultivation, seed-production and bioassays principal causes of mortality and interference. In: J.W. Avault, editor. Proceedings of the Tenth Meeting of the World Mariculture Society, 1979. Louisiana: Baton Rouge. 81 – 91 pp.
- Moss, G.A. 1998. Effect of temperature on the breeding cycle and spawning success of the New Zealand abalone, *Haliotis australis*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32: 139-146.
- Moss, G. A., J. Illingworth y L.J. Tong. 1995. A comparison of two methods to induce spawning in the abalone, *Haliotis iris*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 29: 329-333.
- Mottet, M. 1978. A review of the fishery biology of abalones. *Technical Report of Washington Department of Fisheries* 37: 81-95.
- Munday, P. L. y S. K. Wilson. 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology* 51: 931 –938.
- Mylonas, C. G., G. Cardinaletti, I. Sigelaki y A. Polzonetti-Magni. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture* 246: 467 – 481.

## **N**

- Naidoo, K., G. Maneveldt, K. Ruck y J.J. Bolton. 2006. A comparison of various seaweed-based diets and formulated feed on growth rate of abalone in a land-based aquaculture system. *Journal of Applied Phycology* 18: 437 – 443.
- Najmudeen, T.M. y A.C.C. Victor. 2004. Seed production and juvenile rearing of the tropical abalone *Haliotis varia* Linnaeus 1758. *Aquaculture* 234: 277– 292.

- Nakatsugawa, Y., T. Nagai, K. Hiya, T. Nishizawa y K. Muroga. 1999. A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Haliotis discus discus* affected with amyotrophia. *Diseases of Aquatic Organisms* 36 (2): 159 – 161.
- Naylor, J.R. y P.E. McShane. 2001. Mortality of post-settlement abalone *Haliotis iris* caused by conspecific adults and wave exposure. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research* 35: 363 – 369.
- Nelson, M.M., D. L. Leighton, C.F. Phleger y P. D. Nichols. 2002. Comparison of growth and lipid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, provided specific macroalgal diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 131: 695–712.
- Neori, A., N.L.C. Ragg y M. Shpigel. 1998. The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquacultural Engineering* 17 (4): 215 – 239.
- Neori, A., M. Shpigel y D. Ben-Ezra. 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186: 279 – 291.
- Neori, A., T. Chopin, M. Troell, A.H. Buschmann, G.P. Kraemer, C. Halling, M. Shpigel y C. Yarish. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231(1-4): 361 – 391.
- Neori, A., M. Troell, T. Chopin, C. Yarish, A. Critchley y A.H. Buschmann. 2007. The need for a balanced ecosystem approach to blue revolution aquaculture. *Environment* 49: 37 – 43.
- Newman, G. C. 1967. Reproduction of the South African abalone *Haliotis midae*. *Investigational Report of Division of Sea Fisheries* 64: 1 – 24.
- Nicolas, J.L., O. Basuyaux, J. Mazurié y A. Thébault. 2002. *Vibrio carchariae* a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50: 35 – 43.
- Norton, J. H., M. Dashorst, T. M. Lansky y R. J. Mayer. 1996. An evaluation of some relaxants for use with pearl oysters. *Aquaculture* 144: 39 – 52.
- Núñez, J., Barquín y A. Brito. 1994. Cartografía de la distribución, biología y evaluación de los recursos marisqueros de moluscos litorales canarios: lapas, orejas de mar y mejillón. 1º fase: La Palma, Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura. Informe técnico del Departamento de Biología Animal. Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife. 323 pp.

Núñez, J., Barquín y A. Brito. 1995. Cartografía de la distribución, biología y evaluación de los recursos marisqueros de moluscos litorales canarios: lapas, orejas de mar y mejillón. 2º fase: Islas de Lanzarote, La Gomera y El Hierro. Informe técnico del Departamento de Biología Animal. Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife. 269 pp.

## O

Onitsuka, T., T. Kawamura, T. Horii, N. Takiguchi y Y. Watanabe. 2008. Survival, Growth and Recruitment of Abalone *Haliotis diversicolor* in Sagami Bay, Japan. *Journal of Shellfish Research* 27(4): 843 – 855.

Osada, M., M. Nishikawa y T. Nomura. 1989. Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94: 595 – 601.

Ossorio, F.A. 1982. Cocina canaria. En: Centro de la cultura popular canaria, editor. Colección Temas Canarios, Santa Cruz de Tenerife. 107 pp.

## P

Packard, M. 1981. Practical invertebrate zoology 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Scientific publications. ISBN 0-632-00755-9, London. 308 pp.

Pascual, M. y J. Núñez. 1999. Poliquetos endobiontes de esponjas de la macaronesia central: Spionidae y Choetpteridae (Polychaeta: Spionida). *Revista de la Academia Canaria de Ciencias* 11(3-4): 121-134.

Pauly, D. 1983. Length-converted catch curves: a powerful tool for fisheries research in the tropics (part I). *Fishbyte* 1: 9 – 13.

Peña, J. 1986. Preliminary study on the induction of artificail spawning in *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck (1975). *Aquaculture* 52: 35-41.

Pérez, J. y E. Moreno. 1991. Invertebrados Marinos de Canarias. En: Cabildo Insular de Gran Canaria, editor. Las Palmas de Gran Canaria. 335 pp.

Poore, G. C. B. 1970. Ecology of New Zealand abalones *Haliotis* species (Mollusca: Gastropoda) 4. Reproduction. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 7: 67 – 84.

Prince, J.D. y W.B. Ford. 1985. Use of anaesthetic to standardize efficiency in sampling abalone populations (Genus: *Haliotis*; Mollusca: Grastropoda). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 36: 701 – 706.

## Q

Qi, Z., H. Liu, B. Li, Y. Mao, Z. Jiang, J. Zhang y J. Fang. 2010. Suitability of two seaweeds, *Gracilaria lemaneiformis* and *Sargassum pallidum*, as feed for the abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture* 300 (1-4): 189 – 193.

## R

Reyes, O.S. y A.C. Fermin. 2003. Terrestrial leaf meals or freshwater aquatic fern as potential feed ingredients for farmed abalone, *Haliotis asinina* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research* 34 (8): 593 – 599.

Ritar, J.A. 2004. The commercial control of spawning in temperate abalone. Final report FRDC project No. 2000/204, Tasmanian Aquaculture and Fisheries Institute, University of Tasmania. 107 pp.

Roberts, R.D. 2001. A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis spp.*). *Journal of Shellfish Research* 20 (2): 571-586.

Roberts, R.D., T. Kawamura y C.M. Nicholson. 1999. Growth and survival of postlarval abalone (*Haliotis iris*) in relation to their development and diatom diet. *Journal of Shellfish Research* 18: 243 – 250.

Roberts, R. D., H. F. Kaspar y R. J. Barker. 2004. Settlement of abalone (*Haliotis iris*) larvae in response to five species of coralline algae. *Journal of Shellfish Research* 23: 975 – 987.

Roberts, R.D., E.F. Keys, G. Prendeville y C.A. Pilditch. 2007. Viability of abalone (*Haliotis iris*) stock enhancement by release of hatchery-reared seed in Marlborough, New Zealand. *Journal of Shellfish Research* 26 (3): 697 – 703.

Robertson-Andersson, D.V., M. Potgieter, J. Hansen, J.J. Bolton, M. Troell, R.J. Anderson, C. Halling y T. Probyn. 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology* 20: 579 – 595.

Rogers-Bennett, L., R. F. Dondanville y J. Kashiwada. 2004. Size specific fecundity of red abalone (*Haliotis rufescens*): evidence for reproductive senescence? *Journal of Shellfish Research* 23: 553 – 560.

Royer, J., M. Ropert, M. Mathieu y K. Costil. 2006. Presence of spionid worms and other epibionts in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) cultures in Normandy, France. *Aquaculture* 253: 461 – 474.



Ruck, K.R. y P.A. Cook. 1998. Sabellid infestations in the shells of South African molluscs: Implications for abalone mariculture. *Journal of Shellfish Research* 17(3): 693 – 699.

Ruellet, T. 2004. Infestation des coquilles d'huîtres *Crassostrea gigas* par les polydores en Basse-Normandie: recommandations et mise au point d'un traitement pour réduire cette nuisance. PhD Thesis, Université de Caen. 536 pp.

## S

Sagara, J. y N. Ninomiya. 1970. On the tear-off of young abalone from the attachment site by four anaesthetics (ethyl carbamic acid, magnesium sulphate, chloral hydrate and sodium diethylbarbituric acid). *Aquaculture* 17: 89 – 95.

Sato-Okoshi, W., K. Okoshi y J. Shaw. 2008. Polydorid species (Polychaeta: Spionidae) in southwestern Australian waters with special reference to *Polydora uncinata* and *Boccardia knoxi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 491–501.

Schiel, D.R. 1993. Experimental evaluation of commercial-scale enhancement of abalone *Haliotis iris* populations in New Zealand. *Marine Ecology Progress Series* 97: 167 – 181.

Seki, T. 1997. Biological studies on the seed production of the northern Japanese abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Bulletin of Tohoku National Fisheries Research Institute* (in Japanese with English abstract) 59: 1 – 71.

Seol, D. W., J. Lee, S. Y. Im y I. S. Park. 2007. Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). *Aquaculture Research* 38: 45 – 49.

Setyono, D.E.D. 2003. Reproductive biology and seed production techniques for tropical abalone (*Haliotis asinina* L.) in eastern Indonesia. PhD thesis, Otago University, Dunedin, New Zealand. 225 pp.

Setyono, D.D. 2004. Broodstock conditioning of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in the laboratory. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia* 36: 1-13.

Sharma, P.D., Nollens, H.H., Keogh, J.A. y P.K. Probert. 2003. Sodium pentobarbitone-induced relaxation in the abalone *Haliotis iris* (Gastropoda): effects of animal size and exposure time. *Aquaculture* 218: 589 – 599.

Shepherd, S.A. 1973. Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*). I. Ecology of five sympatric species. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 24(3): 217–257

- Shepherd, S.A. y H.M. Laws. 1974. Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*). II. Reproduction of five species. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 25: 49 – 62.
- Shepherd, S.A. y J.A. Turner. 1985. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*). VI. Habitat preference and abundance and predators of Juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 93: 285 – 298.
- Shields, J.D., M.A. Buchal y C.S. Friedman. 1998. Microencapsulation as a potential control technique against sabellid worms in abalone culture. *Journal of Shellfish Research* 17(1): 79-83.
- Simon, C. A., H. Kaiser y P. J. Britz. 2004. Infestation of the abalone, *Haliotis midae*, by the sabellid *Terebrasabella heterouncinata*, under intensive culture conditions, and the influence of infestation on abalone growth. *Aquaculture* 232: 29 – 40.
- Simon, C.A., A. Ludford y S. Wynne. 2006. Spionid polychaetes infesting cultured abalone *Haliotis midae* in South Africa. *African Journal of Marine Science* 28(1): 167 – 171.
- Simon, C. A., M. G. Bentley y G. S. Caldwell. 2010. 2,4-Decadienal: exploring a novel approach for the control of polychaete pests on cultured abalone. *Aquaculture* 310: 52 – 60.
- Sobhon, P., S. Apisewatakan, M. Champoo, C. Wanichanon, V. Linthong, M. Kruatrachue, E. Suchart, T. Pumthong y T. Poomthong. 1999. Clasificación de germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia* 25: 3-21.
- Socorro, J.A. 2006. Estudio comparado del desarrollo embrionario y larvario de bocinegro (*Pagrus pagrus*) y de la sama de pluma (*Dentex gibbosus*). Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 282 pp.
- Sokal, R.R., y F.J. Rohlf. 1996. Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. En: H. Blume Ediciones, Madrid. 832 pp.
- Soto, C. G. y G. Burhanuddin. 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 135:149–152.
- Sparre, P., E. Ursin y S. C. Venema. 1989. Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1. Manual. FAO Fishery Technical Paper n° 306. 337 pp.
- Steinbeck, J.R., J.M. Groff, C.S. Friedman, T. McDowell y R.P. Hedrick. 1992. Investigations into a mortality among population of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. Abalone of the world. Adelaide: Fishing News Books. 203 – 213 pp.

- Stephano, J.L. 1992. A study of polyspermy in abalone. In: S. A. Guzman del Proo, M. J. Tegner and S. A. Shepherd, editors. *Abalone of the world*. Adelaide: Fishing News Books. 518 – 526 pp.
- Stoskopf, M. 1993. Anaesthesia. In: L. Brown, editor. *Aquaculture for veterinarians*. Oxford: Pergamon Press. 161 – 167 pp.
- Stott A. E., T. Takeuchi y Y. Koike. 2004. An alternative culture system for the hatchery production of abalone without using livefood. *Aquaculture* 236: 341–360.
- Styan, C.A. 1988. Polyspermy, egg size and the fertilization kinetics of free-spawning marine invertebrates. *American Naturalist* 152: 290-297.
- Summerfelt, R. C y L.S. Smith. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: C. B. Schreck and P. B. Moyle, editors. *Methods in fish biology*. Bethesda: American Fisheries Society. 213 – 272 pp.
- Szekely, C. y K. Molnar. 1990. Treatment of *Ancylodiscoides vistulensis* monogenean infestation of the European catfish (*Silurus glanis*). *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 10: 74 – 77.

## T

- Tahil, A.S. y M.A. Juinio-Menez. 1999. Natural diet, feeding periodicity and functional response to food density of the abalone, *Haliotis asinina* L., (Gastropoda). *Aquaculture Research* 30: 95 – 107.
- Takahashi, K. y A. Koganezawa. 1988. Mass culture of *Ulvelia lens* as a feed for abalone *Haliotis discus hannai*. NOAA Technical Report. NMFS 70: 29 – 36.
- Takami, H., T. Kawamura y Y. Yamashita. 1997. Survival and growth rates of post-larval abalone *Haliotis discus hannai* fed conspecific trail mucus and/or benthic diatom *Cocconeis scutellum* var. parva. *Aquaculture* 152: 129 – 138.
- Takashima, F. 1978. Gametogenesis and reproductive cycle in *Haliotis diversicolor* Reeve. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 65: 1 – 8.
- Takashima, F., M. Okuno, K. Nishimura y M. Nomura. 1978. Gametogenesis and reproductive cycle in *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 65: 1 – 8.
- Togo, T., K. Osanai y M. Morisawa. 1995. Existence of three mechanisms for blocking polyspermy in oocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *The Biological Bulletin* 189: 330-339.

- Toledo, P., R. Haroun, H. Fernández-Palacios, M. Izquierdo y J. Peña. 2000. First culture experiences of *Haliotis coccinea canariensis* in a biofilter system. *Journal of Shellfish Research* 19: 540.
- Tomita, K. 1967. The maturation of the ovaries of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido, Japan. *Scientific Reports of the Hokkaido Fisheries Experimental Station* 7 :1 – 17.
- Tong, L.J., G.A. Moss, P. Redfearn y J. Illingworth. 1992. A manual of techniques for culturing paua, *Haliotis iris*, through to the early juveniles stage. New Zealand Fisheries Technical Report No. 31. MAF Fisheries, Wellington. 134 pp.
- Tutschulte, T. y J.H. Connell. 1981. Reproductive biology of three species of abalones (*Haliotis*) in Southern California. *The Veliger* 23 (3): 195 – 206.

## U

- Uki, N. 1989. Abalone seedling production and its theory. *International Journal of Aquatic Fisheries Technology* 1: 3 – 15.
- Uki, N. y S. Kikuchi. 1981. Technical study on artificial spawning of abalone, Genus *Haliotis*. VII. Comparative examinations of rearing apparatus for conditioning adults of abalone. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* 43: 47 – 51.
- Uki, N. y S. Kikuchi. 1982. Technical study on artificial spawning of abalone, Genus *Haliotis*. VIII. Characteristics of spawning behaviour of *H. discus hannai* induced by ultraviolet irradiation stimulus. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* 44: 83 – 90.
- Uki, N. y S. Kikuchi. 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture* 39: 247-261.
- Uki, N. y T. Watanabe. 1992. Review of the nutritional requirements of abalone (*Haliotis* spp.) and development of more efficient artificial diets. In: S.A. Guzman del Proo, M.J. Tegner, S.A. Shepherd, editors. *Abalone of the World*. Adelaide: Fishing News Books. 504 – 517 pp.
- Uki, N., M. Sagiura y T. Watanabe. 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannai*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 52: 1013 – 1023.

## V

- Vandeppeer, M.E., P.W. Hone, R.J.V. Barneveld y J.N. Havenhand. 1999. The utility of apparent coefficients for predicting comparative growth performance in juvenile greenlip abalone *Haliotis laevigata*. *Journal of Shellfish Research* 18: 235 – 241.
- Vial, H. J., M. Traore, A. H. Fairlamb y R. G. Ridley. 1999. Renewed strategies for drug development against parasitic diseases. *Parasitology Today* 15: 393 – 394.
- Viera, M.P., J.L. Gómez Pinchetti, G. Courtois de Vicoise, A. Bilbao, S. Suárez, R.J. Haroun y M.S. Izquierdo. 2005. Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture* 248: 75 – 82.
- Viera, M.P., G. Courtois de Vicoise, J.L. Gómez-Pinchetti, A. Bilbao, H. Fernandez-Palacios y M.S. Izquierdo. 2011. Comparative performances of juvenile abalone (*Haliotis tuberculata coccinea* Reeve) fed enriched vs non-enriched macroalgae: Effect on growth and body composition. *Aquaculture* 319: 423 – 429.

## W

- Wagner, G. N., R. Arndt y B. Hilton. 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm mortality for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211: 353 – 366.
- Waller, P. J. 1997. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Veterinarian Parasitology* 71:195–207.
- Wang, J.Y., B.S.H. Chen, J. Feng y M.Y. Yu. 2000. Primary observation of spherical viruses from diversicolor abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve). *Journal of Tropical Oceanography* 12: 63 – 67.
- Wang, J., Z. Guo, J. Feng, G. Liu, L. Xu, B. Che y J. Pan. 2004. Virus infection in cultured abalone *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong province, China. *Journal of Shellfish Research* 23 (4): 1163 – 1168.
- Webber, H.H. y A.C. Giese. 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda: Prosobranchiata). *Marine Biology* 4: 152 – 159.
- White, H.I., T. Hecht y B. Potgieter. 1996. The effect of four anaesthetics on *Haliotis midae* and their suitability for application in commercial abalone culture. *Aquaculture* 140: 145 – 151.

Wu, F., L. Xiao, Z. Guofan y W. Chunde. 2009. Effects of the initial size, stocking density and sorting on the growth of juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture Research* 40: 1103 – 1110.

## **Y**

Young, S.J. y J. D. DeMartini. 1970. The reproductive cycle, gonadal histology, and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). *Californian Fish and Game* 56 (4): 298 – 309.

## **Z**

Zar, J. H. 1996. Biostatistical analysis, 3rd edition. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall International. 662 pp.

Zhang, Z. 2008. A simulation study of abalone fertilization. *Journal of Shellfish Research* 27(4): 857 – 864.

