

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFECTO DE LA SALINIDAD Y TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO LARVAL

DE Panopea spp.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA:

MAURICIO ISMAEL BUITIMEA ALVAREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, DICIEMBRE 2011

RESUMEN

La temperatura y la salinidad son dos de las variables ambientales más importantes para el desarrollo organismos marinos, por lo que la evaluación cuantitativa de su efecto es crítica en organismos con potencial de cultivo. En el presente estudio se estudió el efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia y crecimiento larval de la almeja chiluda del Golfo de California, *Panopea globosa*, y el efecto de la temperatura y salinidad sobre la almeja chiluda del Pacífico, *P. generosa*. El experimento con *P. globosa*, consistió en evaluar el efecto de 4 diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30 °C) sobre el crecimiento y sobrevivencia larval, desde el momento de la eclosión hasta la metamorfosis. En *P. generosa* se corrieron dos experimentos independientes con un diseño triplicado de 4 temperaturas (14, 16, 18 y 20 °C) y 4 salinidades (27, 30, 33 y 36 ‰) para evaluar su efecto sobre el porcentaje de eclosión de larvas y sobre el crecimiento de las mismas durante las primeras dos semanas de vida larval. Los tratamientos se corrieron por triplicado en unidades de 6L, y una densidad de cultivo de 1 larva ml⁻¹ (*P. globosa*) o en unidades de 10 ml (huevos) y 200 ml (larvas) en *P. generosa*, con densidad de 12 huevos ml⁻¹ y 15 larvas ml⁻¹ respectivamente. El mayor porcentaje de sobrevivencia de *P. globosa* se observó a 22 °C y 26 °C (30.5% ± 2.7 y 28.4% ± 6.7, respectivamente). El desarrollo larval no se completó a los 18 °C, mientras que a 30 °C se registró una alta mortalidad post-metamorfosis. La mayor tasa de crecimiento (22.5 ± 3.2 µm d⁻¹ y 19.9 ± 1.1 µm d⁻¹) se observó a 26°C y 22°C, respectivamente. En *P. generosa* se tuvo una baja fertilización, y el mayor porcentaje de eclosión se observó en la combinación de 14 °C y 36 psu (2.5%), seguido por 16 °C y 33 psu (1.7%). Las larvas de *P. generosa* crecieron más rápido a 20 °C y 27 – 30 psu

($3.66 \mu\text{m d}^{-1}$), seguidas por 18°C y salinidades de 27 y 33 psu (3.01 ± 0.87 y 3.14 ± 0.54 respectivamente). Se concluye que los requerimientos de temperatura para larvas de *P. globosa* son mayores que en otras especies, y que tanto 18°C como 30°C son temperaturas limitantes para su desarrollo. El mejor crecimiento de *P. generosa* a los $18 - 20^{\circ}\text{C}$, contrasta con reportes previos de Washington, USA, lo que sugiere un corrimiento del óptimo hacia temperaturas superiores en latitudes mas bajas como la de B.C.

Palabras clave: PANOPEA, GLOBOSA, BUITIMEA, LARVAS, TEMPERATURA

EFFECTO DE LA SALINIDAD Y TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO LARVAL

DE *Panopea spp.*

TESIS
QUE PRESENTA:
MAURICIO ISMAEL BUITIMEA ALVAREZ

APROBADA POR:



DR. ZAUL GARCIA EZQUIVEL

Presidente del Jurado



M.C. FRANCISCO LEY LOU

Sinodal propietario



DR. ENRIQUE VALENZUELA ESPINOZA

Sinodal Propietario

DEDICATORIA

A mi mamá que dios me la conserve por mucho tiempo, por todo lo que me ha dado con sus esfuerzos para sacarme adelante a pesar de que tuvo que salir de Ensenada para trabajar en su profesión como maestra de primaria. Por creer en mí como hijo. Muchas gracias mamá.

A mi papa que en paz descanse, porque sin él no hubiera estado yo aquí en el mundo y a pesar de que no lo tuve mucho tiempo a mi lado aun es parte de mí.

A mis dos seres queridos que partieron a mejor vida, a mi tía Rosa María (vía), a quien yo mire como mi otra mama y me apoyo a lo largo de mis estudios desde pequeño. Y mi abuelo Ramón Ismael (chapo), que desde pequeño me enseñó el amor y respeto para el mar llevándome a su lugar de trabajo, un barco atunero. Gracias por todo y que dios los tenga en su gloria.

A mi abuelita Rosa, que con sus platicas, consejos, y cariño me ha ayudado a comprender un poco mas lo que es la vida. Gracias abuelita.

A mi tía Lupita, que con todo su apoyo, sus consejos, sus pláticas y comprensión yo no hubiera llegado hasta aquí. Gracias por todo tía.

A mis dos primos, Iran e Iveth, que siempre han estado conmigo y me han brindado su apoyo cuando lo he necesitado. Muchas gracias.

A Ana Isabel Martínez Rivera, que siempre me ha dado su apoyo y aliento para salir adelante en todos mis proyectos y que siempre ha estado conmigo en los

momentos difíciles, de alegría, de tristeza y de éxito a pesar de estar tan lejos. Muchas gracias.

A todos mis tíos que siempre han estado conmigo en reuniones, en momentos difíciles, momentos de alegría y tristeza. A todos ellos, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra *Alma Mater*, la Universidad Autónoma de Baja California por toda su hospitalidad brindada a sus alumnos que nos cultivamos día a día dentro de sus aulas de estudio.

A la Facultad de Ciencias Marinas por su apoyo como alumno a lo largo de toda la carrera y después de haberla terminado. A todo su personal, muchas gracias.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por su apoyo para la realización de este proyecto de tesis y por su apoyo brindado durante este tiempo.

A CONAPESCA por los apoyos y pagos de honorarios que me brindo a través de los proyectos “Producción piloto en laboratorio de larvas y semillas de almeja generosa, *Panopea spp.*” (2007-2008) y “Producción experimental de semilla de almeja generosa (*Panopea globosa*)” (2008-2009).

A alguien que ya no se encuentra con nosotros pero que durante mis inicios de la carrera me dio ánimos a seguir adelante y me brindo su apoyo como maestro ejemplar, al maestro Armando Rodríguez Pinal que en paz descanse.

Al M.C. Francisco Ley Lou, que de una jardinera de la Facultad me llevo a todo esto de lo que hoy tengo de conocimiento. Por todo su apoyo para la realización de esta tesis. Muchas gracias profe.

Al Doctor Zaul García Esquivel, por todo su apoyo y conocimiento que me ha transferido durante todo este tiempo que he estado trabajando con él, por los proyectos, congresos y salidas. Por todas sus platicas como director de tesis y como amigo. Por sus regaños que mas que regaños han sido consejos que ahora me han servido para superarme. Gracias por todo Zaul.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza, al M.C. Marco Aurelio González Gómez por su apoyo en conjunto con mis compañeros del laboratorio, Claudia, Enrique Valenzuela Jr., Rosa, Keren, Sandra, Aurora, Carlos, Daniela, Alejandra, en fin, a todos los que han estado en este gran equipo liderado por el Dr. Zaul García Esquivel, por todos los momentos de trabajo en conjunto y de diversión, muchas gracias.

Al M.C. José Carlos Garduño Franco, por haber creído en mí para sacar adelante el proyecto del laboratorio de producción en el que saldremos adelante.

A los maestros que de alguna manera contribuyeron en mi desarrollo y me ayudaron en todo, los que me brindaron sus conocimientos durante toda la carrera y me estimularon a seguir adelante.

A mi gran amigo Gustavo Torres Gómez, por la amistad que llevamos desde que estábamos en la primaria, por todo lo que hemos pasado en nuestras diferentes etapas de la vida. Muchas gracias maistro!!!

A mis compañeros de la Facultad con los cuales pase momentos divertidos en las jardineras. Bernardo, Duarte, Luis (Tata), Mitkel, Rigoberto (transito), Torrero, Karla, Lilian, Rosalva y muchos más.

A mi gran amiga Carmen Fragoso, a su familia (Esthela, Alfredo, Christian, Emily y Mirelle), a mis grandes amigas Gina Nicifore y Graciela Barrera. A todos mis nuevos amigos, por su amistad y su apoyo en este poco tiempo que tenemos de conocernos y que espero sea muchísimo tiempo mas, muchas gracias.

Son muchas personas las que han estado conmigo en la vida, desde mis inicios, y a las cuales les agradezco todo lo que ahora soy, pero es imposible mencionar todos sus nombres aquí. A todos ellos Muchas Gracias!!!

INDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivo.....	4
3. Metodología.....	5
3.1 Experimento de temperatura con larvas de <i>P. globosa</i>	5
3.1.1 Obtención y acondicionamiento de reproductores.....	5
3.1.2 Manejo de larvas y diseño experimental.....	6
3.1.3 Mantenimiento de organismos y esquemas de muestreo.....	7
3.1.4 Procesamiento de las muestras.....	9
3.2 Experimento de temperatura y salinidad con larvas de <i>P. generosa</i>	11
3.2.1 Obtención de reproductores y acondicionamiento.....	11
3.2.2 Diseño experimental y mantenimiento de organismos.....	11
3.2.3 Muestreos.....	14
3.2.4 Análisis estadísticos de los datos.....	15
4. Resultados.....	15
4.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y desarrollo de larvas de <i>P. globosa</i>	15
4.1.1 Desarrollo larval.....	19
4.2 Efecto de la salinidad y temperatura en larvas de <i>P. generosa</i>	21
5. Discusiones.....	25
6. Conclusiones.....	28
7. Literatura citada.....	29

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Promedios (\pm error estándar) del porcentaje de sobrevivencia acumulada en 8 días (S%), tasa de crecimiento bruto (TC), razón largo:ancho de la concha (L/A) y talla de metamorfosis (TM) exhibida por larvas de almeja chiluda, *Panopea globosa*, mantenidas a 4 distintas temperaturas experimentales.....17

Tabla 2. Tasa de crecimiento bruto ($\mu\text{m d}^{-1}$) de las larvas en un periodo de 15 días para diferentes combinaciones de salinidad y temperatura. El error estándar está indicado en cada caso.....24

LISTA DE FIGURAS.

- Fig. 1.** a) Organismos reproductores en acondicionamiento durante 3 a 4 semanas en jabsas de plástico dentro de un tanque circular de fibra de vidrio; b) vista de la gónada de una hembra al final del período de acondicionamiento; c) concentrado de óvulos sin fecundar..... **6**
- Fig. 2.** Sistema experimental de cubetas de 6L utilizadas para el cultivo de larvas de *P. globosa* a diferentes temperaturas. Se pueden apreciar los compartimentos del tanque rectangular de fibra de vidrio, con divisiones de vidrio forradas con poliestireno en ambos lados..... **9**
- Fig. 3.** Microscopio compuesto Zeiss Axiolab con cámara Sony Handycam montada en un tubo especial para el microscopio con el que se procesaron las muestras del experimento. **10**
- Fig. 4.** Sistema de vasos plásticos con tapa donde se mantuvieron las larvas de *P. generosa* en salinidades y temperaturas..... **13**
- Fig. 5.** Cambios temporales en el promedio de la talla de la concha (largo y ancho) exhibidas por *P. globosa* durante el desarrollo larval y poslarval temprano a 4 diferentes temperaturas (18, 22,26 y 30°C). La barra indica el intervalo de tallas a las que ocurrió la metamorfosis..... **16**
- Fig. 6.** Relación ancho – largo de la concha para un total de 713 larvas de *P. globosa*..... **18**
- Fig. 7.** Estadios tempranos de *P. globosa*. A. Ovulo mostrando cuerpo polar (flecha); B. Larva trocófora temprana; C. Larva veliger de charnela recta o “D”; D. Véliger umbada; E. Pediveliger (pie indicado con la flecha); H. poslarva de 1 semana post-fijación. Escala de la barra = 80 μ m..... **20**
- Fig. 8.** Porcentajes de eclosión de larvas “D” de *P. generosa* en un periodo de 48 horas después de la fertilización, bajo diferentes combinaciones de salinidad y temperatura..... **22**
- Fig. 9.** Cambios temporales en el promedio de la longitud de la concha exhibidas por *P. generosa* durante el desarrollo larval a 4 diferentes temperaturas (14, 16, 18 y 20 °C) y 4 salinidades (27, 30, 33 y 36 psu)..... **23**
- Fig. 10.** Relación largo - ancho de la concha para un total de 1448 larvas de *P. generosa*..... **24**

1. INTRODUCCION.

En la costa del Pacífico mexicano habitan dos especies de la almeja “generosa” o “chiluda”, las cuales son *Panopea globosa* y *Panopea generosa*. La primera es endémica del Golfo de California y esta reportada desde San Felipe hasta Bahía de Los Ángeles (Baja California), costas de Sonora y Bahía Magdalena (Baja California Sur). Esta especie también es conocida como almeja de sifón o almeja de agua. En relación con *P. generosa*, que habita en la costa del Océano Pacífico y tiene su distribución que comprende desde las penínsulas de Alaska hasta Baja California.

Este género es considerado como uno de lo que presentan las especies de almeja más grandes en el mundo. Viven enterradas en el sedimento marino (< 1 metro) y presenta un largo sifón que se extiende hasta la superficie para filtrar el agua y obtener su alimento. Estos organismos son longevos, pueden vivir hasta 85 años reportados para *P. zelandica* y 165 años para *P. abrupta* (citado por Aragón-Noriega *et al.*, 2007).

En la actualidad, estos moluscos son muy demandados en nuestra región porque tienen un alto valor comercial en el mercado de exportación, lo que ha generado un incremento considerable en la explotación de los bancos naturales.

Las estadísticas sobre la capturas de estos bivalvos, señalan incrementos de 200 toneladas en 2002 hasta 1,300 toneladas en 2006 (Secretaría de

Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Delegación Baja California). Este gran incremento en la explotación de los bancos naturales, ha generado preocupación en el sector productivo y gubernamental. Tal preocupación llevo a estos sectores en el año de 2007 al Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California con el fin de iniciar esfuerzos, orientados al desarrollo de la tecnología para producir semilla de esta almeja en el laboratorio con fines de maricultivo y/o repoblamiento.

El cultivo de este molusco bivalvo como cualquier otro organismo, requiere del conocimiento básico de su biología. En la actualidad, son escasos los estudios relacionados con *Panopea spp* de nuestra región. Solamente existen algunas informaciones sobre *P. globosa*, donde describen que su ciclo de maduración comprende de Septiembre a Enero y presenta desoves en el periodo comprendido de Diciembre a Enero (Aragón *et al.* 2007, Calderón-Aguilera *et al.* 2010). A diferencia con *P. generosa*, especie que habita en la costa de Pacifico de Baja California, su periodo de desove en Baja California comprende de Marzo a Julio (com. pers de Zaul Garcia-Esquivel, Instituto de Investigaciones Oceanológicas).

En el proceso de producción de semilla de moluscos, se requiere del control de 3 fases de desarrollo: etapa larval, semilla temprana y etapa posterior de pre-engorda. Para estas fases, se requiere de infraestructuras para producción

y asentamiento de las larvas, y cultivo de poslarvas tempranas. Además, un estricto control en la calidad del agua, alimentación, temperatura y salinidad para los organismos.

En los aspectos de distribución y desarrollo de los moluscos bivalvos, son considerados a la salinidad y la temperatura como las variables ambientales más importantes (Delgado y Pérez-Camacho 2007). Se han observado que las fluctuaciones en estas variables, son capaces de generar una amplia gama de respuestas fisiológicas y pueden estar reflejadas en el desarrollo, tasa de filtración, consumo de oxígeno y otros aspectos más. Estos pueden tener un impacto importante sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos, especialmente en los estadios tempranos.

Hay diferentes estudios donde se ha determinado la tolerancia a la salinidad en larvas y/o embriones de moluscos bivalvos de importancia comercial como es el caso de la escalopa *Argopecten irradians* (Tettelbach y Rhodes, 1981), el mejillón *Mytilopsis leucophaeata* (Verween et al., 2007) y la almeja chiluda *Panopea generosa* (Goodwin, 1973). Asimismo, para desarrollar el cultivo de mejillones en Chile y optimizar la producción masiva de semillas en sistemas controlados, consideraron necesario evaluar el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Ruiz et al., 2008).

El creciente interés por el cultivo de esta almeja, requiere comprender el efecto de factores ambientales en sistemas controlados, como base para la toma de decisiones (Goodwin, 1973). En base a lo anterior, se realizó el presente estudio con la finalidad de conocer los requerimientos de temperatura y salinidad de larvas de *Panopea spp*. Este tipo de información no solamente permitirá mejorar la producción controlada de *Panopea spp* en laboratorio, sino también aportará información sobre los requerimientos ambientales de este género en su entorno natural.

2. OBJETIVO.

- Evaluar la tasa de crecimiento y sobrevivencia de las larvas del *P. globosa* en respuesta a diferentes temperaturas.
- Evaluar la tasa de crecimiento y sobrevivencia de las larvas del *P. generosa* en respuesta a diferentes temperaturas y salinidades.

3. METODOLOGIA.

3.1 EXPERIMENTO DE TEMPERATURA CON LARVAS DE *P. globosa*.

3.1.1 OBTENCION Y ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES.

Treinta ejemplares de almejas adultas de la especie *P. globosa*, colectados en el área de San Felipe, Baja California, México. Los organismos fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología de Moluscos, situado en el edificio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, donde se acondicionaron dentro de jabs de plástico a una temperatura de 19 °C por un periodo de 3 a 4 semanas (Fig. 1a).

Una vez maduros, los organismos se disectaron para exponer la gónada, la cual fue raspada como método para la obtención de óvulos y espermas (Fig. 1b). Los óvulos fueron fecundados con una mezcla de esperma de varios machos en una cubeta graduada de 20 litros y se dejaron reposar por 30 minutos. Paso siguiente se procedió a observar al microscopio para revisar la formación del primer cuerpo polar y después pasar el contenido de la cubeta a un tanque cilíndrico de 200 litros. En este tanque cilíndrico, se dejó reposar con aireación ligera por un periodo de 48 horas. Esto con la finalidad de obtener las larvas véliger de charnela recta o "D", para utilizarlas en el experimento.

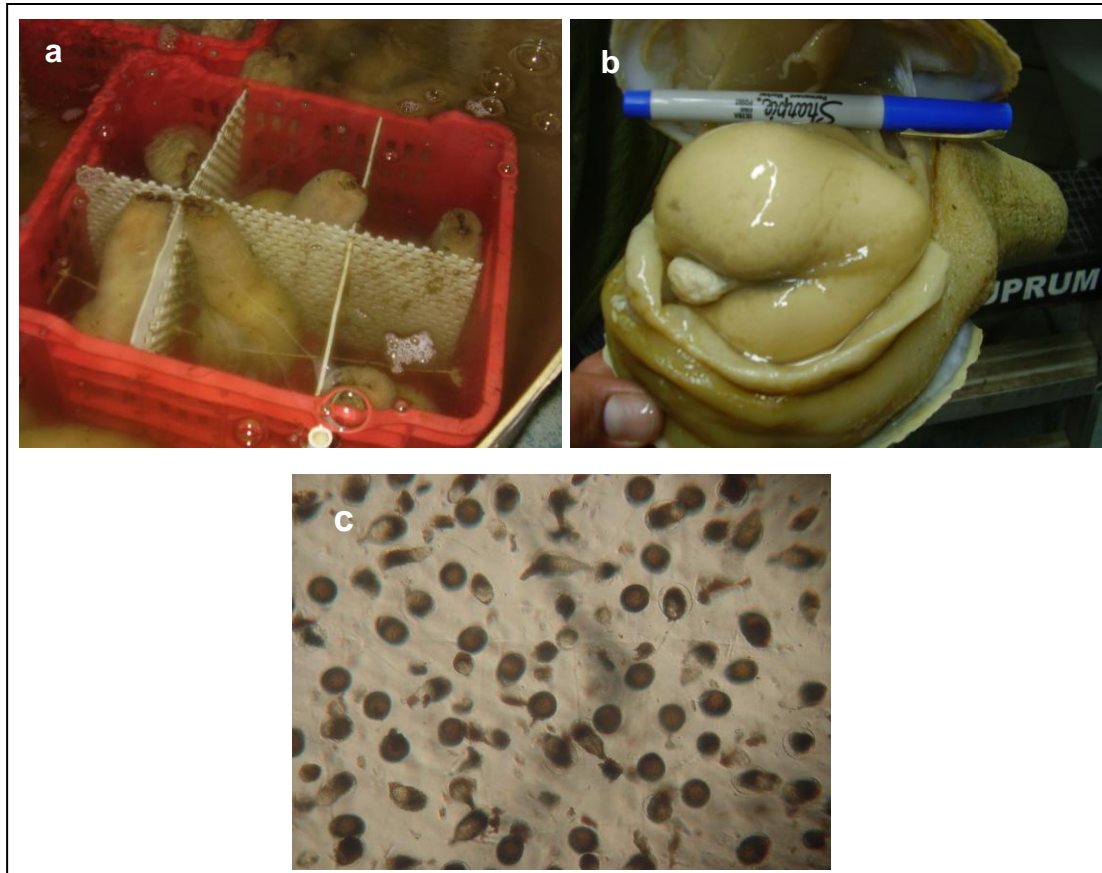


Fig. 1. a) Organismos reproductores en acondicionamiento durante 3 a 4 semanas en jabas de plástico dentro de un tanque circular de fibra de vidrio; b) vista de la gónada de una hembra al final del período de acondicionamiento; c) concentrado de óvulos sin fecundar.

3.1.2 MANEJO DE LARVAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

En el presente estudio se utilizaron las siguientes temperaturas experimentales del agua de mar: 18, 22, 26 y 30 °C. Estas se mantuvieron constantes por medio de calentadores con resistencia de 300 watts. Un total de

72,000 larvas “D” fueron repartidas en 12 cubetas plásticas de 6 litros de capacidad (Fig. 2). Estas cubetas fueron llenadas con agua filtrada (1µm) y esterilizada con una lámpara de rayos UV.

Las cubetas experimentales se distribuyeron en grupos de 3 (réplicas) para cada una de las siguientes temperaturas: 18, 22, 26 y 30 °C. Cada grupo fue colocado dentro de un tanque de fibra de vidrio de 3 compartimientos independientes, conteniendo su propio calentón con controlador digital y aislados entre sí por paneles de poliestireno para evitar “contaminación” por temperaturas. Las cubetas mantuvieron una aireación constante por medio de mangueras de silicón para acuario con difusores de poro fino. Estas mangueras estuvieron orientadas hacia el centro, para tener una mejor homogenización del agua y movimiento de las larvas.

3.1.3 MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS Y ESQUEMAS DE MUESTREO.

Las larvas experimentales fueron alimentadas dos veces diariamente, mañana y tarde comenzando con una densidad de 15, 000 cel/ml de T-Iso el primer día de muestreo hasta llegar a una densidad de 50, 000 cel/ml antes de finalizar el experimento. El hecho de proporcionar el alimento en las mañanas y las tardes fue evitar la acumulación de materia orgánica en descomposición y contaminación del sistema experimental.

Los muestreos fueron realizados cada tercer día. Con la misma periodicidad se hicieron los recambios del agua y limpieza de cubetas. Durante la toma de muestras, se desconectaba la aireación en la cubeta y se homogenizaba por un minuto su contenido con un agitador manual. Se tomaron muestras de un mililitro por cubeta utilizando un pipeteador automático Eppendorf y se transfirieron a microtubos de 1.5 ml. Paso siguiente, se fijaron las larvas con formol salino, y se conservaron en esa condición hasta ser procesadas para su evaluación de talla y/o sobrevivencia.

Al término de los muestreos en las cubetas, todo el contenido se pasaba por un tamiz de malla apropiada para eliminar basura y conchas de larvas más pequeñas que estuvieran muertas. Luego se llenaron de nuevo con agua de mar filtrada y pasada por UV. Un día anterior al muestreo se llenaba un recipiente con agua de mar filtrada con el fin de calentarla a temperatura de 30 °C, la más alta del experimento. Paso posterior, se llenaban las cubetas y se ajustaban a las diferentes temperaturas experimentales.

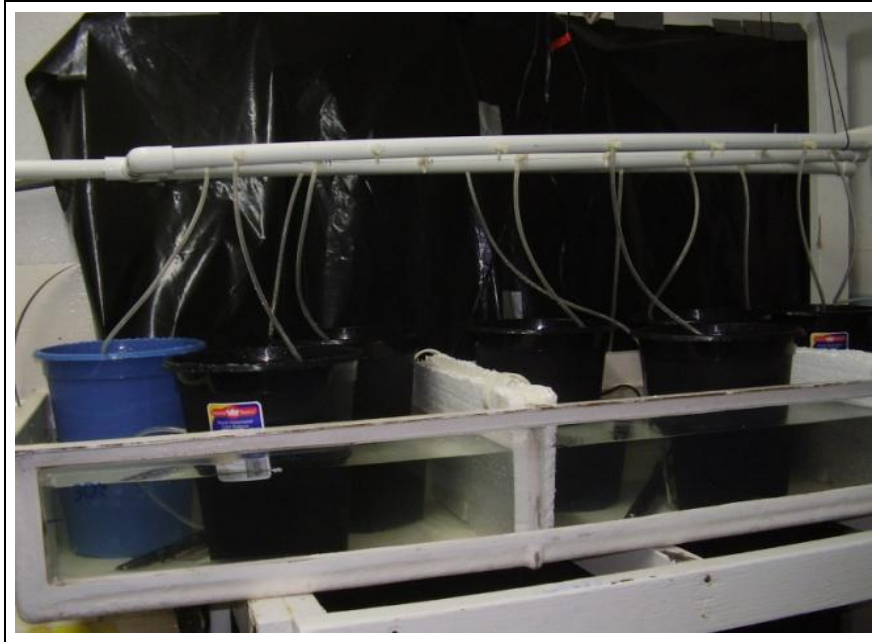


Fig. 2. Sistema experimental de cubetas de 6L utilizadas para el cultivo de larvas de *P. globosa* a diferentes temperaturas. Se pueden apreciar los compartimentos del tanque rectangular de fibra de vidrio, con divisiones de vidrio forradas con poliestireno en ambos lados.

3.1.4 PROCESAMIENTOS DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de larvas fueron procesadas en el laboratorio, donde se realizaron mediciones de tallas y cuantificaciones de las larvas vivas y muertas. Para lo anterior, se utilizó un microscopio compuesto marca ZEISS AXIOLAB, con un ocular graduado y un objetivo de 5X o 10X, dependiendo del estadio de desarrollo (Fig. 3). Además, se registraron los estadios de desarrollo con base a la morfología de las larvas en cada fecha de muestreo. Este procedimiento se realizó para todas las muestras que se tomaron durante el experimento.

En relación con la talla de las larvas, se consideró largo y ancho de la concha. En referencia al porcentaje de sobrevivencia (S, %), se contaron todas las larvas vivas y muertas de cada muestra para obtener el porcentaje de sobrevivencia de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S (\%) = (N_t/N_i) * 100$$

Donde S= porcentaje de sobrevivencia, N_i y N_t cantidad de larvas presentes en cada recipiente al inicio del experimento y al tiempo t.



Fig. 3. Microscopio compuesto Zeiss Axiolab con cámara Sony Handycam montada en un tubo especial para el microscopio con el que se procesaron las muestras del experimento.

3.2 EXPERIMENTO DE TEMPERATURA Y SALINIDAD CON LARVAS DE *P. generosa*.

3.2.1 OBTENCION DE REPRODUCTORES Y ACONDICIONAMIENTO.

El manejo de reproductores de *P. generosa* se realizó con los mismos procedimientos de *P. globosa*, excepto que los reproductores solamente se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante una semana a una temperatura de 12 °C.

3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS

Se realizaron dos experimentos. El primero fue para evaluar el efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre el porcentaje de eclosión de larvas de *P. generosa*. Se utilizó sal sintética OCEANPURE (Commodity Axis Inc., Camarillo, CA) y agua destilada para preparar agua de mar sintética con 4 distintas salinidades (27, 30, 33 y 36 psu). El agua de mar sintética se colocó en cajas de plástico tipo Greiner de 6 pozos (35 mm diámetro). Un total de 1000 óvulos fertilizados fueron colocados en 8 cajas de plástico tipo Greiner de 6 hoyos a una concentración final de aprox. 125 huevos por pozo (12.5 huevos/ml de agua). Se utilizó una combinación de 4 salinidades x 4 temperaturas (14, 16, 18, 20 °C) x 3 réplicas (pозos). Las cajas multipozos fueron colocadas dentro de incubadoras a la temperatura apropiada, donde permanecieron por un total de 48h. Al final de ese período se detuvo el experimento y se evaluó el porcentaje de eclosión (E, %) como:

$$E (\%) = (N_t/N_i)*100$$

Donde N_i y N_t son el número inicial de huevos incubados y el número de larvas “D” obtenidas después de 48h de incubación, respectivamente.

El segundo experimento fue diseñado para evaluar el efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento larval. Se utilizaron 48 recipientes de plástico de 200 ml con tapa como unidades experimentales, los cuales fueron llenados con 150 ml de agua de mar sintética. El agua de mar sintética con la salinidad apropiada se preparó de forma similar al primer experimento. Un total de 1,500 larvas “D” de *P. generosa* fueron colocadas en cada unidad experimental (15 larvas ml⁻¹)

Los recipientes experimentales se colocaron sobre un panel de poliestireno previamente perforado, y esta a su vez fue colocada dentro de un tanque de fibra de vidrio con compartimentos conteniendo agua de mar a distintas temperaturas (Fig. 4). El poliestireno mantuvo una doble función: servir como base para detener los recipientes experimentales, y servir como aislante para mantener la temperatura experimental. Un total de 4 temperaturas (14, 16, 18 y 20 °C) x 4 salinidades (27, 30, 33 y 36 ‰) x 3 réplicas (recipientes de 200 ml) fueron utilizados en este experimento.

Las temperaturas en los compartimentos fueron mantenidas constantes por medio de enfriadores de titanio tipo serpentín o calentones de titanio tipo

bayoneta de 300W. Los compartimientos se mantuvieron aislados entre sí por medio de separadores de vidrio y paneles de poliestireno. Los recipientes tuvieron aireación constante para tener una oxigenación y movimiento de las larvas. Durante el experimento de 18 días de duración, los organismos fueron alimentados cada 48 h con una densidad de alimento de 15, 000 cel/ml de T-Iso al inicio y fue aumentando según los requerimientos de las larvas. El hecho de proporcionar el alimento en este intervalo de tiempo fue evitar la acumulación de materia orgánica en descomposición y por consiguiente contaminación al sistema experimental.



Fig. 4. Sistema de vasos plásticos con tapa donde se mantuvieron las larvas de *P. generosa* en salinidades y temperaturas.

3.2.3 MUESTREOS.

Los muestreos de los vasos fueron realizados cada tercer día para evitar que las larvas se estresaran. Los días de muestreo también se realizó limpieza de recipientes experimentales y recambios de agua.

Durante la toma de muestras, se desconectaba la aireación de los recipientes y el agua con larvas se homogenizaba por un minuto con un agitador manual. Se tomó una muestra de un mililitro por recipiente utilizando un pipeteador automático eppendorf. Paso siguiente se utilizó un microscopio para el conteo de las larvas y medición de tallas.

Al terminar de realizar los muestreos en los recipientes, su contenido se pasaba por un tamiz de 125 µm para eliminar basuras y conchas de larvas más pequeñas que estaban muertas. El agua para el recambio fue filtrada, esterilizada, y ajustada a las salinidades y temperaturas experimentales específicas. Esta agua de recambio fue preparada con un día de anticipación.

La talla de las larvas (largo y ancho de la concha) se evaluó bajo el microscopio compuesto. En referencia al porcentaje de sobrevivencia (S, %), se contaron todas las larvas vivas y muertas de cada muestra para obtener el porcentaje de sobrevivencia de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S (\%) = (N_t/N_i)*100$$

Donde S = porcentaje de sobrevivencia, N_i y N_t cantidad de larvas presentes en cada recipiente al inicio del experimento y al tiempo t .

3.2.4 ANALISIS ESTADISTICOS DE LOS DATOS.

Los datos obtenidos de las mediciones de las larvas, tallas y densidades, fueron procesados con el programa estadístico "Sigma Stat". Con este programa, los datos de crecimiento se ajustaron mediante regresión lineal, y la pendiente de la recta se consideró como la tasa de crecimiento bruto. Los datos de sobrevivencia se compararon para cada temperatura mediante análisis de varianza.

4. RESULTADOS.

4.1 EFECTO DE TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LARVAS DE *P. globosa*.

El patrón y magnitud de crecimiento larval fue similar para las larvas sometidas a 22 – 30 °C, pero las larvas de 18 °C crecieron significativamente más lento (Fig. 5).

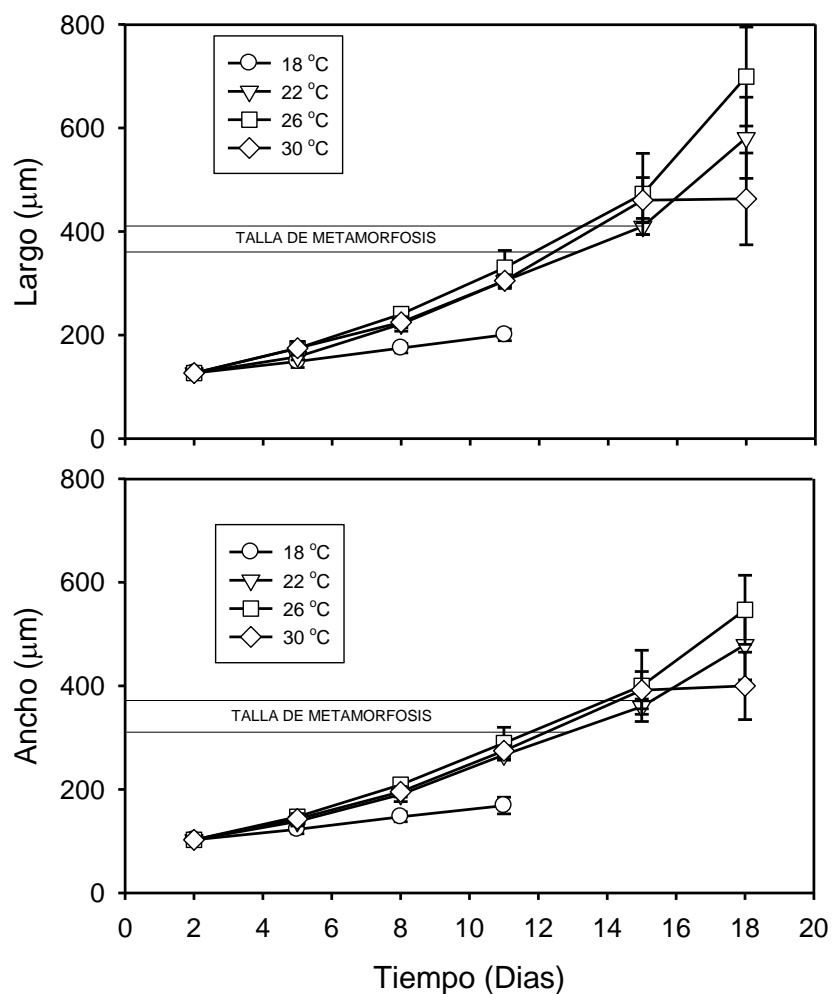


Fig. 5. Cambios temporales en el promedio de la talla de la concha (largo y ancho) exhibidas por *P. globosa* durante el desarrollo larval y poslarval temprano a 4 diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C). La barra indica el intervalo de tallas a las que ocurrió la metamorfosis.

Una vez que se completó la metamorfosis, a las 360 – 390 µm de longitud de la concha (Tabla 1), el crecimiento postlarval fue mayor a los 26 °C, seguido por 22 °C (Fig. 5). Es importante notar que la mayor sobrevivencia de

P. globosa después de 8 días de etapa larval se observó en los tratamientos de 22 y 26 °C (30.5 ± 2.7 y 28.4 ± 6.7 % respectivamente), y la menor (12.2 ± 2.4 %) a 18 °C (Tabla 1).

Tabla 1. Promedios (\pm error estándar) del porcentaje de sobrevivencia acumulada en 8 días (S%), tasa de crecimiento bruto (TC), razón largo:ancho de la concha (L/A) y talla de metamorfosis (TM) exhibida por larvas de almeja chiluda, *Panopea globosa*, mantenidas a 4 distintas temperaturas experimentales.

Variable	18°C	22°C	26°C	30°C
S (%)	12.2 ± 2.4	30.5 ± 2.7	28.4 ± 6.7	18.7 ± 2.3
TC ($\mu\text{m d}^{-1}$)	7.9 ± 0.7	19.9 ± 1.1	22.5 ± 3.2	19.5 ± 0.5
Razón L/A	---	1.1 ± 0.02	1.2 ± 0.01	1.1 ± 0.01
TM Largo (μm) (max – min)	---	392 ± 10.3 (374 -411)	391.3 ± 10.6 (369 - 403)	364 ± 3.3 (359 - 368)
TM Ancho (μm) (max – min)	---	358.5 ± 5.2 (354 – 369)	340.1 ± 5.8 (328 – 347)	325.1 ± 8 (315 –335)

De hecho las larvas de 18 °C no completaron su desarrollo larval debido a una mortandad masiva que se presentó antes de llegar a esa etapa de

desarrollo y se dio por terminado con los muestreos en ese tratamiento (Tabla 1, Fig. 5). Asimismo, las larvas que estuvieron a temperatura de 30 °C presentaron alta mortalidad poco después de completar su metamorfosis y hubo presencia de protozoarios. Las larvas de 26°C exhibieron la mayor tasa de crecimiento bruto ($22.5 \pm 3.2 \mu\text{m d}^{-1}$), seguidas por las de 22 y 30 °C (Tabla 1). La menor tasa de crecimiento ($7.9 \pm 0.7 \mu\text{m d}^{-1}$) se observó a los 18 °C (Tabla I). En general, la razón largo-ancho de la concha larval de *P. globosa* varió en forma lineal a lo largo del desarrollo larval, independientemente de la temperatura, con un valor de 1.28 (Fig. 6).

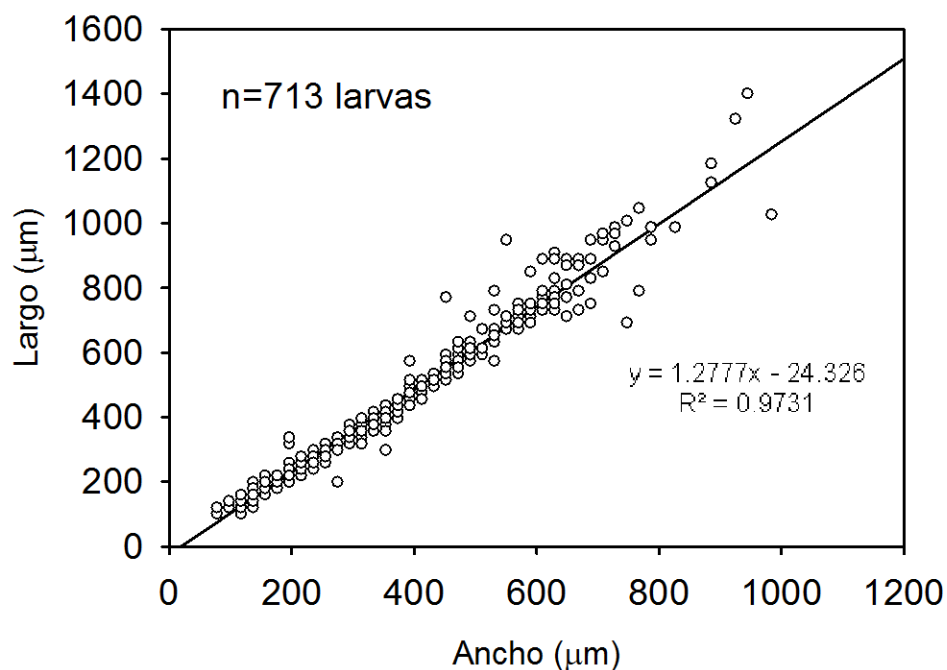


Fig. 6. Relación ancho – largo de la concha para un total de 713 larvas de *P. globosa* ($y=1.2777x-24.326$; $R^2=0.9731$).

4.1.1 DESARROLLO LARVAL

En el experimento observamos que el desarrollo embrionario de *P. globosa*, es idéntico al reportado para otras especies de *Panopea*. Esencialmente, los estudios de desarrollo identificados en el presente experimento incluyeron: aparición del primer cuerpo polar (Fig. 7A), seguido del primer estadio larval o trocófora (Fig. 7B). En el estadio siguiente, apareció la larva veliger de charnela recta, donde se formó una concha y un órgano natatorio ciliado denominado velo. Esta larva veliger también es conocida como larva "D" por su forma (Fig. 7C). Después apareció otro estadio con una protuberancia en la concha llamada umbo (Fig. 7D). A los 13 días aparecieron las larvas pedivelígeras (Fig. 7E), el cual nos indica que las larvas comienzan a metamorfizarse para pasar al estadio de poslarva.

Durante la metamorfosis las larvas tienen un pie completamente desarrollado (Fig. 7F). En este estadio desaparece el velo ciliar. La disoconcha poslarval aparece con espículas en toda la superficie (Fig. 7G), y posteriormente se observa un sifón bien desarrollado con órganos sensoriales alrededor (Fig. 7H).

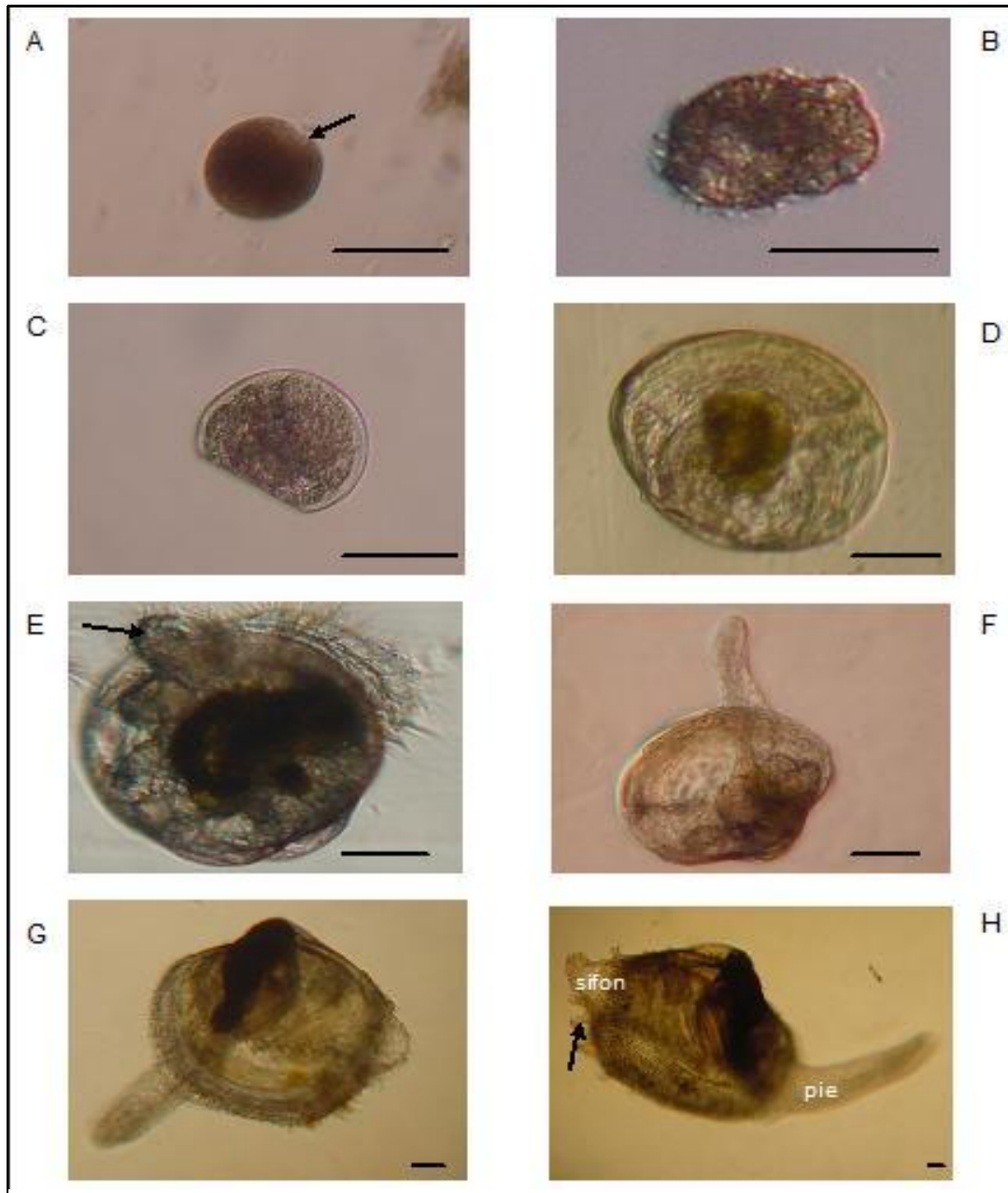


Fig. 7. Estadios tempranos de *P. globosa*. **A.** Ovulo mostrando cuerpo polar (flecha); **B.** Larva trocófora temprana; **C.** Larva veliger de charnela recta o “D”; **D.** Véliger umbada; **E.** Pediveliger (pie indicado con la flecha); **H.** poslarva de 1 semana post-fijación. Escala de la barra = 80 μ m.

La concha poslarval presentó pequeñas espículas en toda la superficie, mientras que el sifón se caracterizó por la presencia de una serie de protuberancias o tentáculos alrededor (órganos sensoriales). Asimismo, el pie poslarval estaba bien desarrollado y le permitía tanto adherirse al sustrato como levantar al organismo completo para su desplazamiento (Fig. 7H).

4.2 EFECTO DE SALINIDAD Y TEMPERATURA EN LARVAS DE *P. generosa*.

En esta especie la obtención de gametas por el método de inducción al desove descrito por Goodwin, *et al.* (1979), solo respondieron un 20 % de las almejas, de las cuales solo eran machos. Por lo que se utilizó el método de raspado de gónada.

En general, el porcentaje de eclosión de los huevos fertilizados, obtenidos mediante raspado gonadal, fue bajo (< 2.6%). No obstante, se pudo observar una tendencia sinérgica de interacción entre la temperatura-salinidad sobre el porcentaje de eclosión de *P. generosa*. El mayor porcentaje de eclosión se observó la combinación de 14 °C y 36 psu (2.5%), seguido de las combinación de 16 °C y 33 psu (1.7%). A temperaturas más altas este sinérgismo no fue tan evidente, y el porcentaje de eclosión fue menor del 0.8% (Fig. 8).

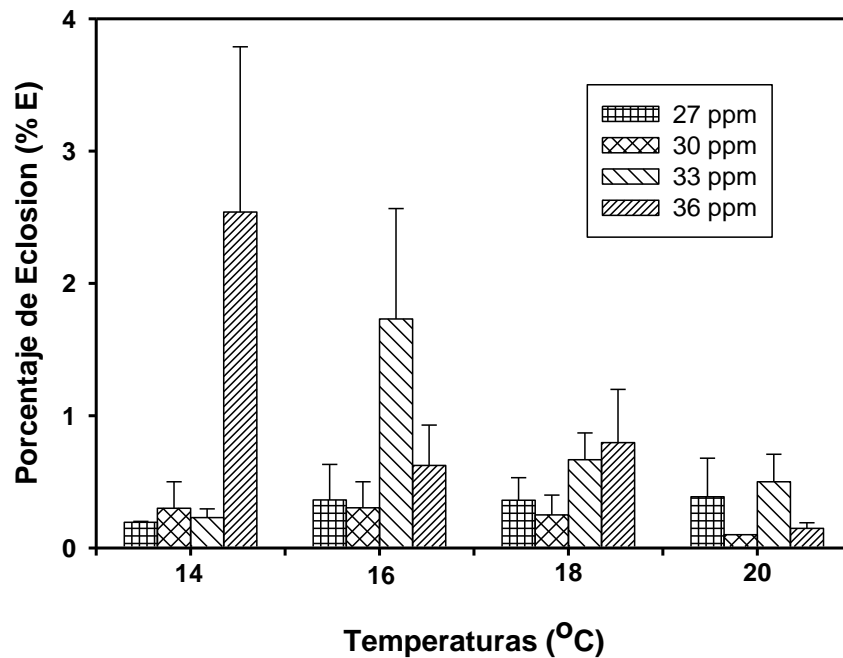


Fig. 8. Porcentajes de eclosión de larvas “D” de *P. generosa* en un periodo de 48 horas después de la fertilización, bajo diferentes combinaciones de salinidad y temperatura.

Los cambios temporales en la longitud y ancho de la concha larval de *P. generosa* durante el segundo experimento mostraron que esta creció más rápidamente a 20 °C en todas las salinidades experimentales, mientras que las de 18 °C crecieron mejor a salinidad de 27 psu (Fig. 9). Cabe aclarar que las larvas de la combinación 20 °C y 36 psu se perdieron accidentalmente después de una semana de experimentación. No obstante, a dicha salinidad no se observaron diferencias claras por efecto de la temperatura en los tres tratamientos restantes (Fig. 9). Las tasas de crecimiento larval (Tabla II), considerando los 15 días de experimentación fueron mayores a 20 °C y

salinidades de 27 y 30 psu ($3.66 \mu\text{m d}^{-1}$), seguidas por 18°C y salinidades de 27 y 33 psu (3.01 ± 0.87 y 3.14 ± 0.54 respectivamente).

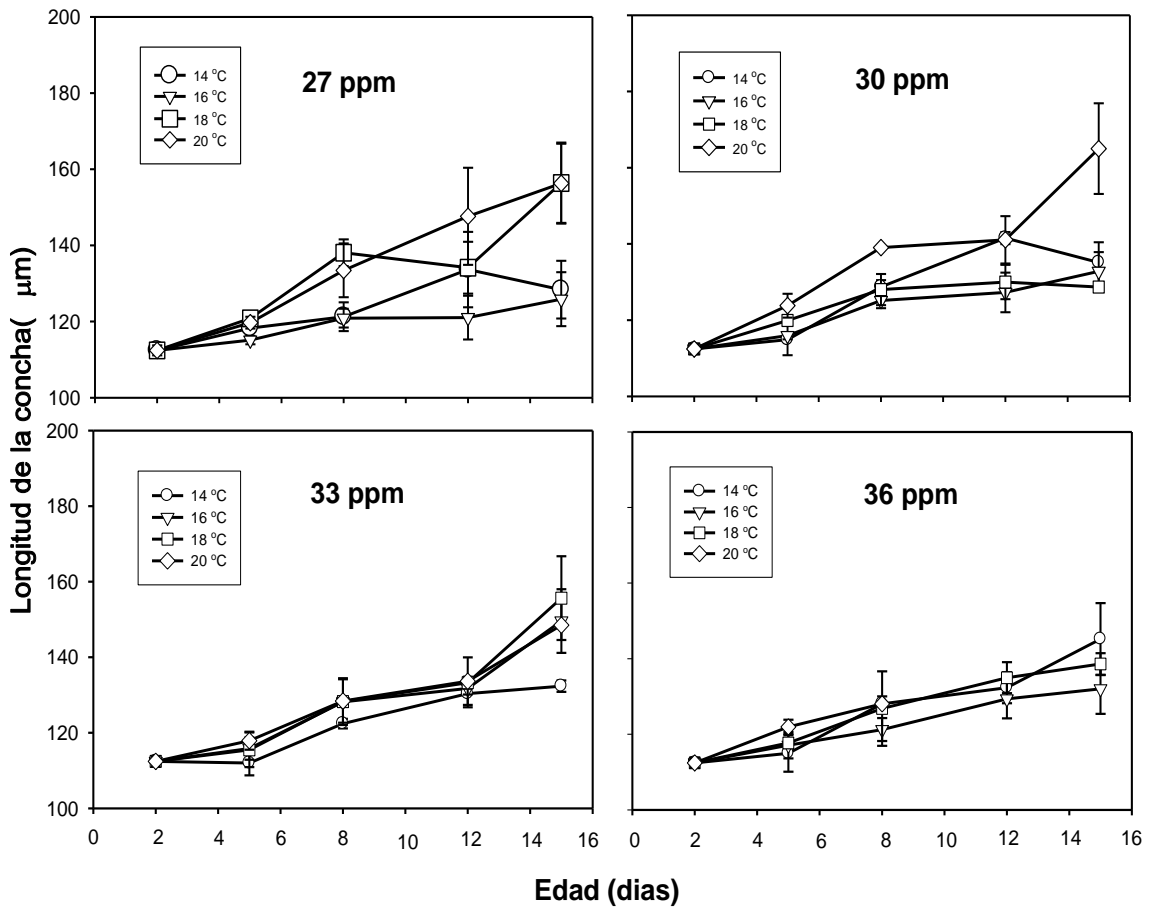


Fig. 9. Cambios temporales en el promedio de la longitud de la concha exhibidas por *P. generosa* durante el desarrollo larval a 4 diferentes temperaturas (14 , 16 , 18 y 20°C) y 4 salinidades (27 , 30 , 33 y 36 psu).

Tabla 2. Tasa de crecimiento bruto ($\mu\text{m d}^{-1}$) de las larvas en un periodo de 15 días para diferentes combinaciones de salinidad y temperatura. El error estándar está indicado en cada caso.

TEMP	SALINIDADES			
	27 ppm	30 ppm	33 ppm	36 ppm
14°C	1.8 ± 0.65	1.9 ± 0.05	1.7 ± 0.15	2.49 ± 0.75
16°C	0.98 ± 0.38	1.56 ± 0.24	2.71 ± 0.64	1.41 ± 0.37
18°C	3.01 ± 0.87	1.47 ± 0.27	3.14 ± 0.54	2.10 ± 0.08
20°C	3.66 ± 0.78	3.66 ± 0.76	2.01 ± 0.55	2.60 ± 0.11

La relación largo-ancho de la concha larval de *P. generosa* varió en forma lineal a lo largo del desarrollo, independientemente de la temperatura de prueba, con un valor constante de proporcionalidad igual a 1.1 (Fig. 10).

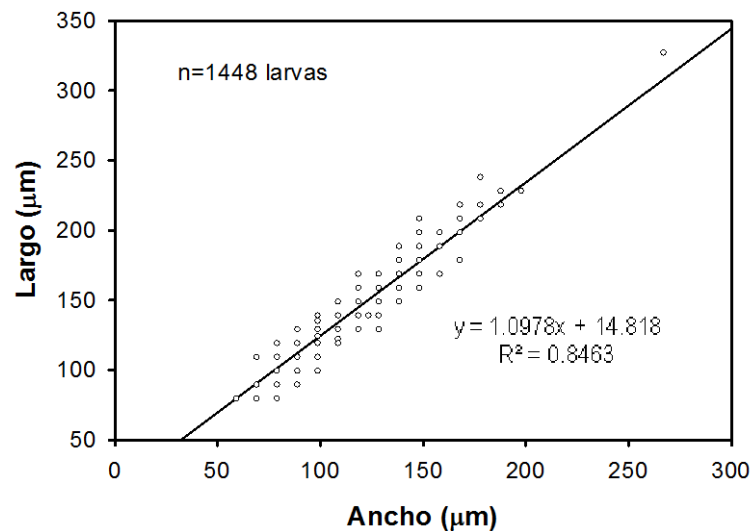


Fig. 10. Relación largo - ancho de la concha para un total de 1448 larvas de *P. generosa* ($y=1.0978x+14.818$; $R^2=0.8463$).

5. DISCUSIONES.

En el presente estudio se realizó la disección de la gónada y su posterior raspado para la extracción de la gametas debido a que el método de estrés térmico no nos funcionó en ninguna de las dos especies. Ya anteriormente Gribben y Hay (2003) había reportaron el método de raspado para producir exitosamente larvas de *P. zelandica* a nivel experimental. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el raspado produjo una buena eficiencia de fertilización de los óvulos en *P. globosa*, pero no en *P. generosa*. Lo anterior sugiere que el paso de los óvulos por el oviducto es una condición obligada en *P. generosa* para que se pueda reiniciar la meiosis de los óvulos, mientras que *P. globosa* tiene una plasticidad similar a la de otros moluscos bivalvos como el ostión, que se fertilizan fácilmente aún sin que hayan pasado por el oviducto (Helm et al, 2006). En cualquiera de los casos, el raspado gonadal implica el sacrificio de los organismos, por lo que es necesario seguir estudiando opciones o métodos alternativos para lograr la inducción al desove de ambas especies.

En cuanto al efecto de la temperatura, fue evidente que *P. globosa* tiene requerimientos más altos que *P. generosa* durante su desarrollo larval, y el límite inferior de tolerancia térmica de la primera (20 °C) aparentemente coincide con el límite superior de la segunda. Esto es compatible con el hábitat típico de cada especie y ventajoso desde el punto de vista de acuicultura, ya

que con los requerimientos térmicos exhibidos por ambas especies es posible manejar alternadamente la producción de ambas especie a lo largos de todo el año. En el primer caso, se sabe que *P. globosa* soporta variaciones significativas de temperatura en el Golfo de California, las cuales van desde 16 °C en invierno hasta 31 °C o mas en verano (Calderón-Aguilera et al., 2010), mientras que *P. generosa* habita en aguas más frías del Pacífico. En particular, las aguas adyacentes a Ensenada, Baja California, tienen una variación estacional con intervalos promedio de temperatura oscilan entre los 11 y 18 °C (Espinoza-Carreón et al., 2001). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que *P. globosa* es una especie tropical que puede cultivarse eficientemente en un intervalo de 22 a 26 °C, mientras que temperaturas por debajo a los 18 °C o por encima de los 30 °C limitan su crecimiento. En contraste, las larvas de *P. generosa* crecieron mejor a temperaturas de 18 – 20 °C y salinidades relativamente bajas, mientras que su porcentaje de eclosión fue mejor entre los 14 y 16 °C. Lo anterior discrepa con estudios previos reportados por Goodwin y su grupo de trabajo (Goodwin, 1973; Goodwin et al., 1979), quienes encontraron que los embriones y larvas de *P. generosa* obtenidas de las costas de Washington se desarrollaron mejor a temperaturas entre de 10 a 14 °C y salinidades de 27 a 32 ppm (Goodwin, 1973), mientras que las larvas completaron alcanzaron la metamorfosis en 17 días a 14 °C. Las discrepancias en las temperaturas óptimas determinadas para embriones y larvas de *P. generosa* originaria de Washington (Goodwin, 1973; Goodwin et

al., 1979) y *P. generosa* de Baja California (presente estudio) probablemente se deban a que esta última está adaptada a aguas relativamente más calientes, lo que correría hacia arriba sus preferidos térmicos y los límites de tolerancia. Tanto en el presente estudio como en el de Goodwin (1973) y Goodwin et al. (1979) fue evidente que las salinidades de 27 a 30 psu sostuvieron un buen crecimiento larval de *P. generosa*, mientras que salinidades mayores de 36 psu redujeron el crecimiento de larvas cultivadas a cualquiera de las temperaturas experimentales utilizadas en el presente trabajo. Lo anterior indica que existe una interacción clara entre el efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento/sobrevivencia de *P. generosa*, teniendo un mayor efecto positivo las salinidades bajas utilizadas en el presente estudio. El preferendo termal de las larvas de *P. generosa* de esta región la ubica como una especie templada, y es parecido al de *P. zelandica* (17 °C, Gribben y Hay, 2003), la cual tarda 17 días en alcanzar su etapa metamórfica.

Finalmente, es importante notar que tanto *P. globosa* como *P. generosa* mantuvieron una relación constante del largo y ancho de la concha durante su desarrollo larval. El hecho de que el valor de la constante de proporcionalidad fuese 1.3 en *P. globosa* y 1.1 en *P. generosa*, indica que la concha larval de la primera es más alargada que en la segunda, lo que puede ser aprovechado desde el punto de vista taxonómico para identificar una y otra especie desde esa etapa temprana de desarrollo.

6. CONCLUSIONES.

- Las larvas de *P. globosa* crecieron mejor a temperaturas entre 22 y 26 °C. Las temperaturas de 18 °C y 30 °C parecen marcar el límite inferior y superior de tolerancia térmica de esta especie.
- El desarrollo embrionario de *P. generosa* es mejor a temperaturas de 14 a 16 °C, mientras que las larvas de la misma especie crecen mejor a temperaturas entre 18 y 20 °C. El crecimiento se redujo a temperaturas bajas (14 °C) o a salinidades altas (36 psu).
- Las larvas de *P. globosa* exhibieron una constante de proporcionalidad lineal largo: ancho de la concha ($L:A= 1.3$) mayor que las larvas de *P. generosa* ($L:A= 1.1$). Dicha relación fue independiente de la temperatura, por lo que dicha constante puede potencialmente servir como indicador de la especie.

7. LITERATURA CITADA

- Aragón-Noriega, E.A., J. Chávez-Villalva, P.E. Gribben, PE, E. Alcántara-Razo, A.N. Maeda-Martínez, E.M. Arámbula-Pujol, A.R. García-Juárez, R. Maldonado-Amparo. 2007. Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) in the central Gulf of California. J. Shellfish Res., 26: 423-431.
- Davis J,P., C. Barenburg, D. Penderson 2000. Burrowing response of juvenile geoducks (*Panopea abrupta*) to changes in temperature and salinity. Journal of Shellfish Research. Vol. 19, no. 1, p. 689.
- Espinoza-Carreón, T.L., Gaxiola-Castro, G., Robles-Pacheco, J.M., Nájera-Martínez, S. 2001. Temperature, salinity, nutrients and chlorophyll *a* in coastal waters of the Southern California Bight. Ciencias Marinas, 27: 397-422.
- Goodwin, C.L., B. Pease. 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) – Pacific geoduck clam. U.S. Fish. Wildl. Serv. Biol. Rep. 82 (11.120). U.S. Army Corps of Engineers, TR EL – 82 – 4. 14 pp.
- Goodwin, L. 1973. Effects of salinity and temperature on embryos of the geoduck clam (*Panopea generosa* Gould). Proc. Natl. Shellfisheries Assoc., 63: 93 - 95.
- Goodwin L., W. Shaul, C. Budd. 1979. Larval development of the geoduck clam (*Panopea generosa*, Gould). Proc. Natl. Shellfisheries Assoc., 69: 73 - 76.

- Gribben, P.E., B.E. Hay, 2003. Larval development of the New Zealand geoduck *Panopea zelandica* (Bivalvia: Hiatellidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37: 231 - 239.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. (comp./ed.). 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, 182 pp.
- Ruiz, M; Tarifeño, E; Llanos-Rivera, A; Padget, Ch; Campos, B. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(1): 51-61.
- Sloan N.A., S.M.C. Robinson. Age and gonad development in the geoduck clam *Panope abrupta* (Conrad) from Southern British Columbia, Canada. *Journal of Shellfish Research*, 4; 131-137.
- Spencer, B.E. 2002. *Molluscan Shellfish Farming*. Blackwell Publishing, MA, USA, 274 pp.
- Tettelbach, S.T., E.W. Rhodes. 1981. Combined effect of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern Bay scallop *Agropecten irradians irradians*. *Marine Biology* 63, 249-256.
- Verween, A., M. Vincx, S. Degraer. 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (Mollusca, Bivalva): The search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 348: 111

