



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA



Conocimiento, Desarrollo y Progreso

**“CRECIMIENTO Y TASAS DE ALIMENTACIÓN DE LA ALMEJA DE SIFÓN,
Panopea globosa DURANTE EL DESARROLLO LARVAL”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA
PRESENTA:
ALEJANDRA FERREIRA ARRIETA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, JULIO 2012

RESUMEN

Se realizaron siete corridas experimentales a 22 °C en larvas de la almeja chiluda, *Panopea globosa*, en dos etapas. En la primera etapa se evaluaron las fases distintivas de desarrollo, crecimiento (TC), sobrevivencia (S), y relación longitud-talla desde la eclosión hasta la etapa metamórfica. En la segunda etapa se cuantificaron tasas de alimentación, peso seco y orgánico en etapas larvales selectas (larvas “D”, umbada temprana, umbada intermedia, umbada tardía, pediveliger). El patrón de desarrollo se determinó mediante observación visual y fotográfica. El peso seco (PS) y orgánico (PO) se determinaron gravimétricamente a 100 y 450 °C respectivamente. La sobrevivencia fue determinada porcentualmente a partir del número inicial de larvas “D” presentes en cada lote. Las tasas de aclaramiento (TA) y las tasas de ingestión (TI) se evaluaron en sistemas estáticos utilizando como alimento la microalga *Isochrysis sp* (clon T-ISO) adicionada a concentraciones de 50, 100, 200 y 300 cel μl^{-1} . Los resultados mostraron que las fases distintivas de desarrollo y el momento de inicio de las mismas fueron: trocófora (20h), veliger o “D” (24h), umbada inicial (5 - 6d), umbada intermedia (6 - 7d), umbada final (9 - 10d) y pediveliger (13-14d). La duración del período larval fue de 13 a 14 días con una talla de asentamiento de 330 a 350 μm y con tasa de crecimiento de aprox. 19.38 $\mu\text{m d}^{-1}$. Se observó una relación potencial entre la longitud (L, μm) y el PO (μg) de las larvas de acuerdo a la ecuación $\text{PO} = 1.62\text{E}^{-6} \text{L}^{2.43}$, mientras que relación PS – PO fue de tipo lineal y se ajustó a la siguiente ecuación: $\text{PO} = 0.076 + 0.4\text{PS}$. El porcentaje de sobrevivencia larval fue alrededor de 50% en tres lotes, y de 20% en dos lotes. Los valores de TA disminuyeron en proporción inversa con la concentración de algas, independientemente del tamaño larval, y variaron entre 0.3 – 1.5 $\mu\text{l h}^{-1}$ (larva “D”) hasta 15 - 59 $\mu\text{l h}^{-1}$ (pediveliger, 330 μm). Por el contrario, La TI aumento constantemente hasta la concentración de 200cel μl^{-1} . En la concentración más alta (300cel μl^{-1}) tanto las larvas “D” como las premetamórficas inhibieron su TI. La TI aumentó desde 57 – 85 cel h^{-1} (larvas “D”) hasta 40 o 50 veces más al llegar a la talla de 330 μm . En conjunto, los datos anteriores revelan que *P. globosa* tiene una fase larval corta con alta sobrevivencia, soporta altas concentraciones de alimento sin inhibir su TI.

Palabras clave: *Panopea spp*, larvas, crecimiento, sobrevivencia, tasas de alimentación.

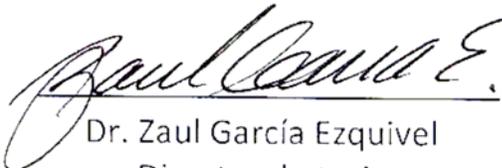
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA ACUACULTURA

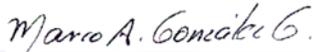
“CRECIMIENTO Y TASAS DE ALIMENTACIÓN DE LA ALMEJA DE SIFÓN, *Panopea globosa* DURANTE EL DESARROLLO LARVAL”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA
PRESENTA:
ALEJANDRA FERREIRA ARRIETA

Aprobada por:



Dr. Zaul García Ezquivel
Director de tesis



M. C. Marco Aurelio Gonzales Gómez
Sinodal



Dr. Enrique Valenzuela Espinoza
Sinodal

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, JULIO 2012

AGRADECIMIENTOS

A la comisión nacional de acuacultura y pesca (conapesca), por el apoyo que me brindo con beca al participar en los proyectos: “Producción experimental de semilla de almeja generosa (*panopea globosa*)” (2008-2009), “Consolidación de la infraestructura y optimización de la tecnología para la producción de semilla de almeja generosa (*Panopea spp*)” (2009-2011).

A la universidad Autónoma de Baja California por haberme permitido realizar mis estudios de licenciatura, así como la Facultad de Ciencias Marinas. A los investigadores que me apoyaron como docentes a lo largo de mi carrera.

En particular al Dr. Zaul García Esquivel, director de esta tesis de licenciatura, por su apoyo incondicional y dedicación en las sugerencias de este trabajo ya que sin su ayuda no hubiera sido posible realizarlo.

De la misma manera quiero agradecer al M.C. Marco Aurelio Gonzales Gómez y al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza por participar como los sinodales de este trabajo.

También deseo dar las gracias al equipo de laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por participar y colaborar con la producción y mantenimiento de las corridas larvales: Sandra Tapia, Mauricio Buitimea, Aurora Tinajero, Daniela Rodríguez y Carlos Vidal.

Por último agradezco a mis padres, al Sr. Alfredo Ferreira Rodríguez y a la Sra. Olga Arrieta Santos por su comprensión, apoyo y su presencia a lo largo de mi carrera.

ÍNDICE

RESUMEN	i
APROBACION DE TESIS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. OBJETIVO GENERAL	10
4. OBJETIVOS PARTICULARES	10
5. METODOLOGÍA	11
5.1 Desarrollo y crecimiento Larval (fase experimental 1)	11
5.2 Efecto de la concentración del alimento sobre las tasas de alimentación (fase experimental 2).	12
6. RESULTADOS	14
6.1 Desarrollo y crecimiento larval (fase Experimental 1)	14

6.2 Efecto de la concentración sobre las tasas de alimentación (fase experimental 2)	18
6.2.1 Relaciones morfométricas	18
6.2.2 Tasas de aclaramiento e ingestión	20
7. DISCUSIÓN	24
8. REFERENCIAS	300

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cambios temporales en la longitud de la concha de <i>p. globosa</i> a lo largo de su desarrollo larval. Cada símbolo representa un lote (L) distinto de larvas. Las líneas de ajuste con sus respectivas ecuaciones se muestran para cada uno de los lotes.	14
2. Estadios de desarrollo larval de la almeja chiluda <i>p. globosa</i> , cultivada en laboratorio: a= trocófora, b= larva de charnela recta, c= umbada temprana, d=umbada intermedia, e= umbada tardia, f= pediveliger y g= postlarva recién metamorfozizada.	17
3. Relacion talla-po en larvas de <i>p. globosa</i> .	18
4. Relacion entre el peso seco (ps) y peso orgánico (po) de larvas de <i>p. globosa</i> .	19

5. Tasas de aclaramiento en 4 estadios larvales de *p. globosa*: a=larva de charnela recta de 144 μm , b= umbada temprana de 237 μm , c=umbada intermedia de 291 μm , d=umbada tardía de 302 μm y e=pediveliger de 330 μm . 21
6. Tasas de ingestión en 4 estadios larvales de *p. globosa*: a=larva de charnela recta de 144 μm , b= umbada temprana de 237 μm , c=umbada intermedia de 291 μm , d=umbada tardía de 302 μm y e=pediveliger de 330 μm . 22

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tasa de crecimiento bruto (TCB), talla de metamorfosis (TM), periodo de la metamorfosis (PM) y talla post-metamorfosis (TP) de 5 lotes de larvas de <i>P. globosa</i> .	1
2. Porcentaje de sobrevivencia de 5 lotes larvales distintos de <i>P. globosa</i> .	16
3. Resultados de Peso seco (PS) y peso orgánico (PO) obtenidos durante el desarrollo larvario de <i>P. globosa</i> .	19
4. Ecuaciones alométricas de la TA ($\mu\text{l h}^{-1}$) y la TI (cel h^{-1}) determinadas en larvas de <i>P. globosa</i> .	23
5. Comparación de la duración del periodo larval (PL), tasa de crecimiento bruto (TCB) y talla de metamorfosis (TM) en especies del genero <i>Panopea</i> ; T= temperatura de cultivo larval.	25
6. Comparación de TI exhibidos por estadios larvales selectos de especies	28

representativas de moluscos bivalvos alimentados con la microflagelada *I. galbana* clon *T-ISO*. Los valores de TI son los máximos reportados para cada especie a la concentración indicada. T= temperatura, C= concentración de células, TI= tasa de ingestión. Los estadios larvales referidos son: ChaR= charnela recta, UmT= umbada temprana, UmF= umbada tardía y Pe= pediveliger.

1. INTRODUCCIÓN

La almeja de sifón, *Panopea globosa*, también conocida como almeja generosa, almeja chiluda o almeja de agua, es una especie cuya distribución va desde el Alto Golfo en el Golfo de California, hasta Bahía Magdalena en el Pacífico de BCS. Junto con la almeja del Pacífico. *P. generosa*, soporta una pesquería de alrededor de 1200 ton año⁻¹ de captura, lo que representa un ingreso anual aproximado de 18 000 millones de dólares americanos (Calderón-Aguilera, 2010). Debido a la presión que se ejerce sobre la pesquería de almeja chiluda en las zonas de pesca de las costas de Baja California se vio la necesidad de desarrollar trabajos orientados a la producción de semilla en el laboratorio con fines de repoblamiento o cultivo en campo.

Para implementar un cultivo en el laboratorio se requiere entre otras cosas conocer el ciclo reproductivo de la especie de interés, así como los requerimientos ambientales y las necesidades de alimento a lo largo de su desarrollo. Se sabe que los requerimientos de alimento de cualquier especie varían en función de factores intrínsecos como el estadio de desarrollo. Asimismo, entre los factores externos que influyen sobre las tasas de alimentación se encuentran la temperatura y la concentración de alimento. Debido a esto, el crecimiento de los moluscos depende del balance neto entre la ingesta de alimento y las pérdidas de energía (Winter, 1978).

Las tasas de alimentación de bivalvos marinos son ampliamente utilizados como herramienta para definir las raciones y mejorar las practicas de producción en el laboratorio con fines de acuacultura.

Los moluscos se distinguen por presentar varios estadios de desarrollo distintivos durante su etapa larval planctónica. No obstante, el primer estadio que se alimenta es la larva véliger de charnela recta (conocida también como larva "D"), en esta etapa las larvas tiene cilios largos y cilios cortos, los primeros son para la natación y los segundos para trasportar las partículas de alimento hacia la boca (Galtsoff, 1964). Otros estadios de desarrollo distintivo incluyen la larva véliger umbada temprana y tardía, así como la fase pedivelígera o premetamórfica. Esta última caracterizada por la presencia del pie y la tendencia a buscar un sustrato para asentarse previo a la metamorfosis. Se sabe que la cantidad de alimento aumenta en forma potencial conforme crece la larva, llegando a un máximo en la fase premetamórfica. No obstante, los requerimientos específicos de alimento de los moluscos dependen de la concentración del alimento. Esto debido a que tanto los estadios larvales como poslarvales de moluscos son capaces de regular su tasa de filtración o aclaramiento (o bombeo) con el fin de mantener constante su tasa de ingestión de microalgas sobre un amplio rango de concentraciones (Winter, 1978). A concentraciones relativamente altas las tasas de ingestión se reducen drásticamente, limitando así la posibilidad de generar crecimiento positivo.

Una de las herramientas clásicas para evaluar el grado de desarrollo larval es mediante la observación directa de su morfología y talla bajo el microscopio. Asimismo, es posible cuantificar la demanda de alimento de un estadio particular y su respuesta concentración-dependiente mediante experimentos manipulativos en sistemas estáticos o de flujo continuo (Bayne, 1983; Beiras *et al*, 1994). La determinación de las tasas de alimentación estadio-dependiente es una condición necesaria para poder optimizar protocolos de cultivo de cualquier especie.

2. ANTECEDENTES

El primer estadio larval de moluscos bivalvos, llamado trocófora, no consume alimento particulado, pero sí presenta una corona ciliada bien desarrollada que le sirve como órgano de natación. El segundo estadio larval, el de charnela recta o larva "D", es el primero con capacidad para alimentarse y presenta un velo con cilios, los cuales capturan el alimento y este es transportado hacia la boca (Galtsoff, 1964). Durante las siguientes etapas de desarrollo larval tales como umbada temprana, umbada tardía y premetamórfica, las larvas de moluscos bivalvos continúan alimentándose de las partículas que hay en el medio, por lo que se les llaman planctotróficas. Anteriormente se creía que las larvas metamórficas no eran capaces de alimentarse durante varios días, basándose en la premisa de que durante ese período el velo estaba siendo reabsorbido y las branquias rudimentarias aún no se forman completamente (Ej. Bayne, 1965; Sastry, 1965; Hickman y Gruffydd 1971). Sin embargo, estudios más recientes llevados a cabo mediante fluorescencia con larvas del ostión *Crassostrea virginica*, han demostrado que el período de inanición completa asociado a la metamorfosis dura solamente unas horas, justo durante la fase de cementación de las larvas metamórficas (Baker y Mann, 1994). Antes y después de ese período las larvas son capaces de ingerir alimento particulado, aunque no en suficiente cantidad como para cubrir los requerimientos energéticos que conlleva la metamorfosis. Así, Baker y Mann (1994) encontraron que de 200 larvas estudiadas recién asentadas solo el 16%

exhibió extensión del velo y consumió microesferas fluorescentes recubiertas de extracto fitoplanctónico, mientras que el resto no extendió el velo ni acarrearón partículas hacia las branquias rudimentarias.

Entre los grupos distintivos de larvas de moluscos en que ya se han realizado evaluaciones de tasas de alimentación corresponden a la ostra europea *Ostrea edulis* (Bruce *et al.*, 1939), el mejillón *Mytilus edulis* (Bayne, 1965) y el caracol *Nassarius obsoletus* (Pechenik y Fisher, 1979). El rango de concentración de células de *Isochrysis galbana* que se han expuesto para su valoración es de 2 a 300 cel μl^{-1} (Bayne, 1983). El método que generalmente se ha realizado para cuantificar las tasas de aclaramiento es de tipo indirecto el cual se basa en la tasa de remoción de partículas en suspensión en un volumen conocido. Son cuatro supuestos que son fundamentales para que en realidad se estime las tasas de aclaramiento a partir de la remoción de partículas en suspensión (Coughlan, 1969): (1) la reducción en la concentración de partículas es debida a la filtración y al asentamiento gravitacional, (2) la tasa de filtración del animal es constante, (3) las muestras de suspensión todo el tiempo es constante y (4) la eficiencia de retención de partículas es del 100%. La formula de este método indirecto es la siguiente; $TA = (\ln C_f - \ln C_i) / t$, donde TA= tasa de aclaramiento, C_f = concentración final, C_i =concentración inicial y t= tiempo (Coughlan, 1969).

En general, las tasas de aclaramiento e ingestión en larvas de moluscos marinos dependen de la temperatura, el tamaño de la partícula, la edad/talla de la larva y la

concentración de partículas (Bayne, 1983). La eficiencia de selección de partículas es mayor cuando el diámetro de estas cae en el intervalo de 2 a 6 μm . A diámetros menores de 2 μm disminuye la eficiencia de selección de partículas, mientras que la captura de partículas mayores de 6 μm dependerá del tamaño de la apertura oral del organismo (Bayne, 1983; Winter, 1978). La tasa de ingestión depende de la capacidad gástrica del organismo (Navarro *et al*, 1994) además del tiempo de retención, lo que a su vez depende directamente del tamaño de partícula (Bayne, 1983).

Se sabe que la variación de las tasas fisiológicas, incluyendo las tasas de aclaramiento e ingestión varían en función de la talla o peso del organismo. En general en moluscos esta relación es alométrica (revisado por Bayne, 1983) y se comporta de acuerdo a una curva potencial del tipo $Y = aW^b$, donde Y = tasa fisiológica (TA o TI), a =valor de la constante, W = peso y b = es el valor del exponente alométrico. El valor del exponente que relaciona la tasa de ingestión con el peso orgánico del organismo se ha calculado en alrededor de 1.0 en larvas de *Ostrea edulis* (Beiras *et al*, 1994) y *Crassostrea gigas* (Gerdes, 1983), mientras que el exponente alométrico que relaciona la tasa de ingestión larval con la longitud de la concha típicamente varía entre 2.0 y 3.5 (Sprung, 1984; Beiras *et al*, 1994). También se ha encontrado que la alometría se mantiene en las relaciones de longitud-peso, con un valor de exponente que varía entre 2.5 y 3.0 (Beiras *et al*, 1994).

A cualquier concentración de partículas las tasas de alimentación se incrementan con la talla de las larvas (Bayne, 1983). Un comportamiento típico de tasas de aclaramiento (TA, ml de agua filtrada h^{-1}) y tasas de ingestión (TI, No. células ingeridas h^{-1}) en relación a la concentración de partículas fue descrito con detalle por Winter (1978) para moluscos bivalvos de acuerdo a lo siguiente: a) a concentraciones bajas de alimento la TA es directamente proporcional a la concentración de partículas. Una vez que se alcanza el valor máximo de TA, esta se mantiene constante en un intervalo corto y después tiende a disminuir exponencialmente en función de la concentración de partículas en el medio. Por otra parte, la TI aumenta proporcionalmente con la concentración de alimento hasta llegar a un máximo que coincide con la concentración a la cual la TA comienza a disminuir. La TI se mantiene constante bajo un amplio rango de concentración de alimento, y se inhibe a concentraciones relativamente altas (Winter, 1978). Lo anterior indica que los moluscos bivalvos son capaces de regular su TA para mantener una TI máxima sobre un intervalo amplio de concentración de alimento.

Desde 1970 se iniciaron los primeros esfuerzos de cultivo de almejas “geoduck” del Pacífico (*Panopea generosa*) en el Departamento de Pesca del estado de Washington (WDFW; iniciales del departamento de pesca en inglés). Los reproductores se obtuvieron del medio natural y la estimulación del desove se llevó a cabo mediante flujo de agua, alimento y temperatura, el cultivo larvario se realizó en tanques con

densidades de 1 - 10 Larvas ml^{-1} , se alimentaron 2 veces al día y se realizaron recambios de agua cada 4 a 5 días. Posteriormente al acercarse a la etapa de metamorfosis las larvas fueron trasladadas a sistemas de flujo descendente para la fijación. Una vez obtenida la semilla, esta se pasó a la zona intermareal protegida con tuberías de ABS cubiertas, y logrando con este método una sobrevivencia de 15 a 70% (Feldman *et. al*, 2004).

Aragón-Noriega y colaboradores (2007) fueron de los primeros investigadores que realizaron estudios sobre la biología básica de *P. globosa* en la costa este del Golfo de California (Bahía Guaymas Empalme, Sonora en las coordenadas 27° 53"N y 110° 43), realizando muestreos de ejemplares durante un año (octubre 2004 a octubre 2005). Reporto en 2007 que la gametogénesis de *P. globosa* comienza a principios de otoño (octubre) y finaliza con el desove a principios de invierno (Enero). El ciclo reproductivo se ve influenciado por la temperatura del agua, la cual alcanza los 30 °C en verano. El desarrollo gametogénico incrementa al decaer la temperatura del agua, observándose organismos maduros cuando la temperatura superficial es de 20°C, mientras que el desove acontece al exhibirse una temperatura superficial más baja de 18.8 °C. Esto coincide con el estudio que realizó Calderón-Aguilera *et al*, (2010) durante marzo 2008 a marzo 2009 a lo largo de la costa de San Felipe B. C. en el Golfo de California (coordenadas 31°15"N 114° 45"O), el ciclo gametogénico en esta zona fue similar que en Empalme Sonora (desde octubre a enero). Así mismo la temperatura

superficial afecto en el desarrollo gonadal ya que aquella disminuyó drásticamente desde 29.2 °C en agosto a 15.8 °C en enero. Calderón-Aguilera *et al.* (2010) mencionan que durante el estado agotado del desarrollo gametogénico se observó una concentración alta de clorofila-a (3.08 mg m^{-3}), lo cual refleja que las larvas además de aprovechar el aumento de la temperatura, se benefician con la alta productividad primaria que hay en San Felipe.

En el invierno del 2007-2008 el grupo de trabajo del laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO-UABC) inició investigaciones orientadas hacia el desarrollo de una biotecnología para el cultivo controlado de *P. globosa* con fines de repoblamiento y/o cultivo, lográndose durante ese período una producción de aproximadamente 50,000 semillas de esa especie. Debido a la necesidad de investigar con detalle el requerimiento de alimento durante el desarrollo larval de *P. globosa*, se planteó la siguiente investigación.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento, sobrevivencia y demanda de alimento de la almeja de sifón, *Panopea globosa* durante el desarrollo larval.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Documentar los estadios larvales distintivos y la duración de cada fase en *P. globosa*.
- 2.) Evaluar la tasa de crecimiento de larvas de *Panopea globosa*.
- 4) Cuantificar la sobrevivencia de *P. globosa* desde la primera hasta la última fase larval.
- 5) Determinar las relaciones longitud-peso durante el desarrollo larval de *P. globosa*.
- 6) Cuantificar las tasas de aclaramiento (TA) e ingestión (TI) de larvas de *P. globosa* en función de la concentración de alimento, y estimar las ecuaciones alométricas correspondientes.

5. METODOLOGÍA

5.1 Desarrollo y crecimiento Larval (fase experimental 1)

Se utilizaron organismos maduros en cinco ocasiones para obtener 5 lotes distintos de gametos mediante raspado de gónada. Las larvas fueron cultivadas en tanques cónicos de 500 L a 22.1 ± 0.09 °C, estas fueron alimentadas diariamente con la microflagelada *Isochrysis galbana* (clon T-iso) ofrecida a concentraciones de 5,000 a 60,000 cel ml⁻¹ dependiendo de la talla. A partir del estadio de charnela recta se tomaron muestras de los diferentes lotes de cultivo mediante un tamiz de malla adecuado (75% del la longitud dorso ventral). Las larvas se observaron al microscopio diariamente y se registro el estadio larval mediante observación visual y fotográfica con una cámara SONY NEX-5, cuando menos se midieron 15 larvas de su longitud antero posterior y la longitud dorso ventral. Cada dos días se realizo el recambio de agua. La evaluación se suspendió una vez que las larvas alcanzaron el estadio pedivéliger.

Una vez que se obtuvieron los datos de talla, se realizaron gráficas de talla larval en función del tiempo y se calculo la tasa de crecimiento bruto (TCB, $\mu\text{m d}^{-1}$) en cada una de las corridas larvales ajustando una regresión lineal. La pendiente de la misma se considero como la TCB.

La sobrevivencia fue determinada porcentualmente a partir de la razón entre el número inicial de larvas “D” y el número final de larvas pediveliger presentes en cada lote, de acuerdo a la ecuación:

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

Donde S= porcentaje de sobrevivencia, N_f =numero de larvas pediveliger, N_i =numero de larvas "D".

5.2 Efecto de la concentración del alimento sobre las tasas de alimentación (fase experimental 2).

Las tasas de alimentación (TA y TI) se llevarán a cabo en corridas larvales independientes de las que se usaron para estimar las tasas de crecimiento. Una vez que se identificó claramente los estadios de desarrollo correspondientes a la fase de charnela recta (144 μm), umbada temprana (237 μm), umbada intermedia (291 μm), umbada tardía (302 μm) y pediveliger (330 μm), se evaluarán las TA y TI de acuerdo al siguiente protocolo (Perez *et al.*, 1994): Se utilizaron por triplicado cámaras de incubación de 20 ml, a las cuales se les adiciono larvas a una densidad conocida (10 a 90 larvas ml^{-1}), dependiendo de la talla, la microalga *I. galbana* se suministro a concentraciones de 50, 100, 200 y 300 cel μl^{-1} . Se utilizaron dos réplicas control (microalgas, no organismos) por cada concentración, para corregir por sedimentación microalgal. La duración de la incubación fue entre 1 y 4h, dependiendo de la cantidad y edad de organismos, la concentración inicial de las microalgas no se redujo en más del 30% durante el período de incubación. Al inicio y al final del periodo de incubación se cuantifico la concentración de microalgas en las cámaras mediante un contador de partículas Multisizer 3.

Las TA y TI se cuantificaron en base a las ecuaciones de Coughlan (1969) y Paffenhoffer (1971), y se corrigieron por la sedimentación de las microalgas (S) como sigue:

$$TA = V/nt [\ln(C_i/(C_f+S))]$$

$$TI = V/nt [C_i-(C_f+S)]$$

$$S = [C_i] (C'_i - C'_f)/(C'_i)$$

Donde V= volumen de incubación, $C_f - C_i$ = concentración final e inicial de la muestra, $C'_f - C'_i$ = concentración final e inicial del control, n= número de organismos, t= tiempo de incubación y S= sedimentación de la microalga.

Los datos obtenidos de TA y TI fueron graficados para cada talla/estadio de desarrollo en función de la concentración de alimento.

Una vez que terminó la incubación, las larvas experimentales fueron retenidas en filtros GF/C utilizando una bomba manual de vacío. Posteriormente se secaron a 100 °C y se incineraron a 450 °C por 24 horas con el fin de determinar el peso seco (PS) y peso orgánico (PO).

6. RESULTADOS

6.1 Desarrollo y crecimiento larval (fase Experimental 1)

Con base a las 5 corridas realizadas, se observa que la duración del periodo larval de *P. globosa* fue entre 13 y 14 días (Fig. 1). Las larvas de los lotes 2 y 5 alcanzaron la etapa premetamórfica a los 13 días, mientras que las de los lotes 1 y 3 la alcanzaron a los 14 días. El patrón de crecimiento de la concha a partir del estadio de charnela recta ("D") hasta pedivéliger fue lineal en todos los casos (Fig.1).

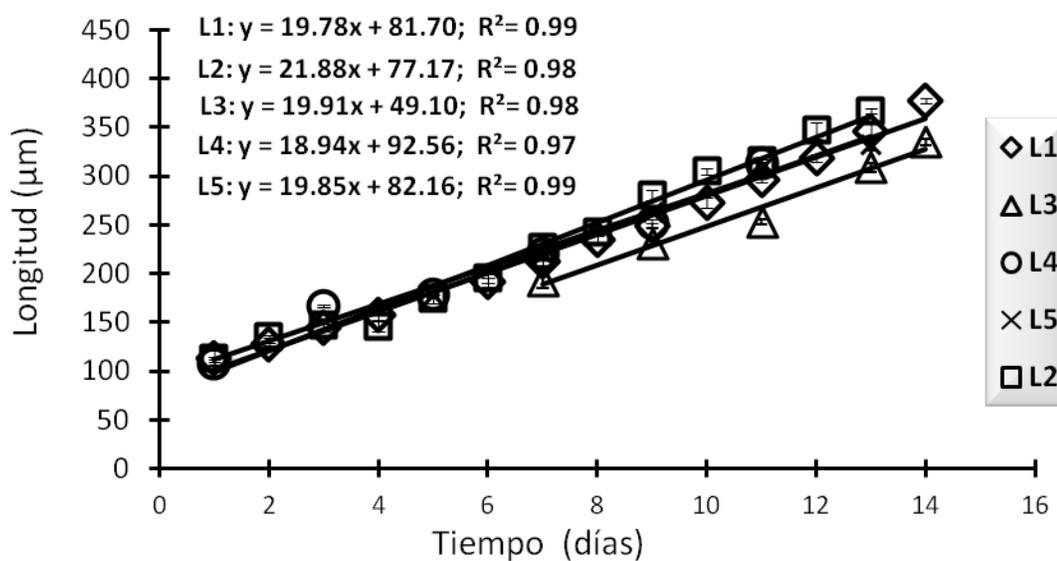


Fig. 1. Cambios temporales en la longitud de la concha de *P. globosa* a lo largo de su desarrollo larval. Cada símbolo representa un lote (L) distinto de larvas. Las líneas de ajuste con sus respectivas ecuaciones se muestran para cada uno de los lotes.

La tasa de crecimiento larval de *P. globosa*, estimadas como la pendiente de la recta de ajuste, variaron entre $18.9 \mu\text{m d}^{-1}$ (lote 4) y $21.9 \mu\text{m d}^{-1}$ (lote 2). El asentamiento se observó cuando la concha larval alcanzó entre 332.4 ± 6.8 y $346.5 \pm 8.1 \mu\text{m}$ de largo, y entre 283.9 ± 5.9 a $294.1 \pm 2.8 \mu\text{m}$ de ancho (Tabla 1). La duración del período de metamorfosis fue entre 2 y 3 días. Al final de dicho período la postlarva presentó una longitud de concha entre 405.9 ± 6.6 a $437.6 \pm 8.3 \mu\text{m}$ (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de crecimiento bruto (TCB), talla de metamorfosis (TM), periodo de la metamorfosis (PM) y talla post-metamorfosis (TP) de 5 lotes de larvas de *P. globosa*.

Lote	TCB ($\mu\text{m dia}^{-1}$)	TM		PM (días)	TP	
		Largo (μm)	Ancho (μm)		Largo (μm)	Ancho (μm)
1	19.8 ± 0.99	345.2 ± 5.3	291.1 ± 4.4	2	428.0 ± 9.7	370.4 ± 9.3
2	21.9 ± 0.97	346.5 ± 8.1	284.0 ± 5.9	2 a 3	405.9 ± 6.6	345.2 ± 6.3
3	19.9 ± 0.97	334.8 ± 5.9	291.6 ± 7.1	N/D	N/D	N/D
4	18.9 ± 0.97	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
5	19.9 ± 0.99	332.4 ± 3.6	294.1 ± 2.8	3	437.6 ± 8.3	380.6 ± 8.1

El porcentaje de sobrevivencia larval de *P. globosa*, considerando desde el estadio de charnela recta hasta la fase pediveliger fue de alrededor de un 50% para tres

lotes (lotes 1, 3 y 5), mientras que en dos lotes (lotes 2 y 3) se observó una sobrevivencia cercana al 20% (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de sobrevivencia de 5 lotes larvales distintos de *P. globosa*.

Lote	Sobrevivencia Larval (%)
1	51.66
2	18.11
3	52.91
4	22.42
5	48.75
Promedio \pm Err Std	38.77 \pm 8

Considerando los 5 lotes larvales, se pudieron identificar claramente 6 estadios distintivos de desarrollo de *P. globosa* (Fig. 2). Sus características y el momento de inicio de los mismos fueron: A) larva trocófora: se observó a las 21hrs post-fertilización y se caracterizó por su forma irregular a una talla de $93.31 \pm 1.6 - 99 \pm 1.6 \mu\text{m}$, B) véliger de charnela recta o "D" temprana ($113.52 \pm 1.3 - 127.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$): apareció a las 24h y presentó una concha característica en forma de letra "D", C) véliger umbada inicial ($174 \pm 4.7 - 178.2 \pm 2.7 \mu\text{m}$): posterior a la larva de charnela recta. Se observó

entre los 5 y 6 días post-metamorfosis, D) véliger umbada intermedia (231.18 ± 3.0 - $280.5 \pm 4.9 \mu\text{m}$): se observó entre los 6 – 7 días y se caracterizó por presentar una concha redondeada, E) véliger umbada tardía (253.06 ± 4.5 - $315.93 \pm 3.9 \mu\text{m}$): se mostró entre los 9 y 10 días con un umbo muy marcado. Finalmente la fase pediveliger (F) o pre-metamórfica (332.35 ± 6.8 - $336.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$) apareció entre los 13-14 días con un pie. La postlarva metamorfozizada (G), ($405.9 \pm 6.6 \mu\text{m}$) apareció a los 15 - 16 días con un pie totalmente formado y sin velo o cilios asociados al velo (Fig. 2).

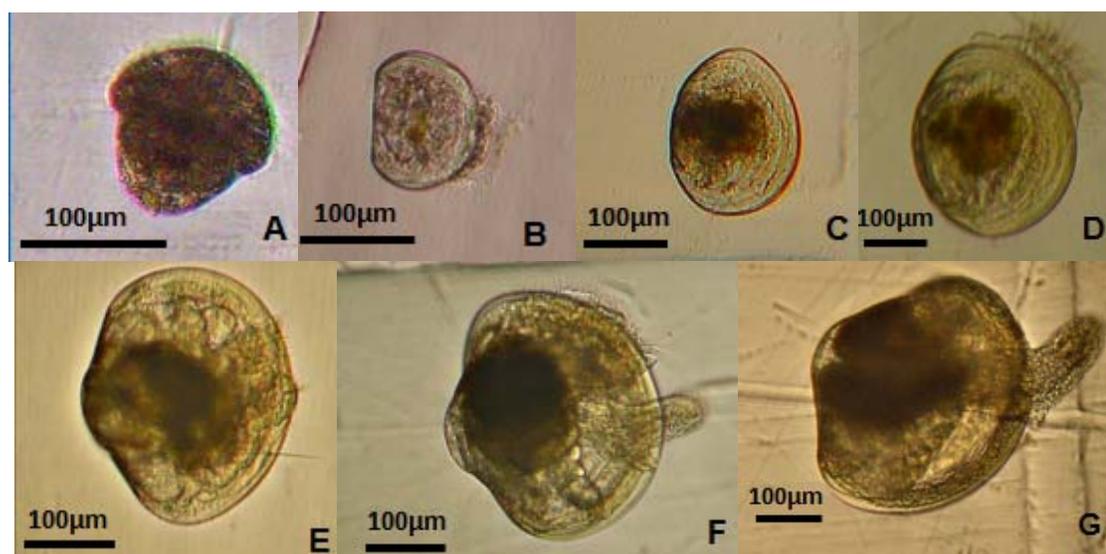


Fig. 2. Estadios de desarrollo larval de la almeja chiluda *P. globosa*, cultivada en laboratorio: A= trocófora, B= larva de charnela recta, C= umbada temprana, D=umbada intermedia, E= umbada tardia, F= pediveliger y G= postlarva recién metamorfozizada.

6.2 Efecto de la concentración sobre las tasas de alimentación (fase experimental 2)

6.2.1 Relaciones morfométricas

Las larvas de *P. globosa* utilizadas para evaluar las tasas de aclaramiento e ingestión (corridas 6 y 7) incluyeron todos los estadios de desarrollo identificados en la fase experimental 1 (Fig. 2). La talla (longitud) y el peso orgánico (peso libre de cenizas) de las larvas experimentales exhibieron una relación alométrica de tipo potencial, con un valor del exponente igual a 2.43 (Fig. 3).

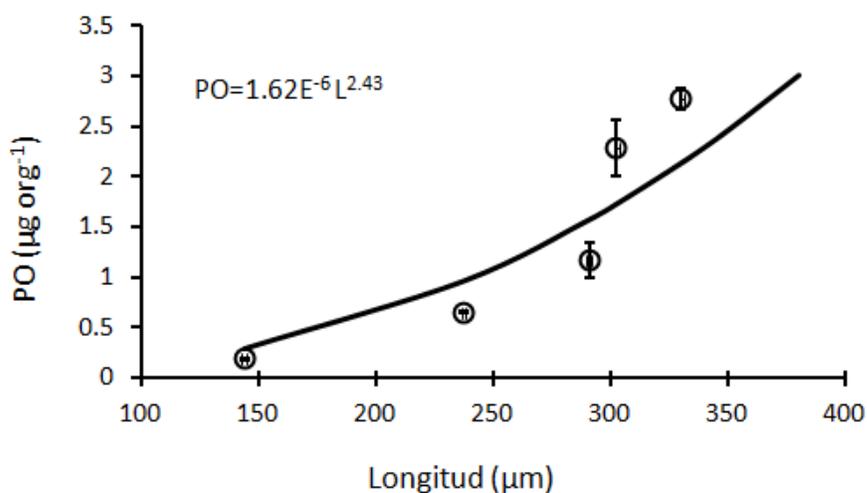


Fig. 3. Relación talla-PO en larvas de *P. globosa*

La relación peso seco – peso libre de cenizas de las mismas larvas fue de tipo lineal (Fig. 4).

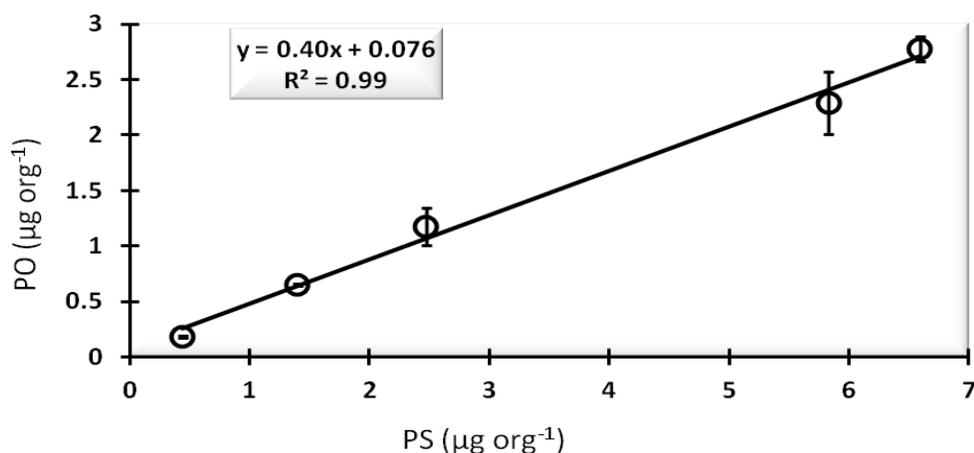


Fig. 4. Relación entre el peso seco (PS) y peso orgánico (PO) de larvas de *P. globosa*.

El peso seco de las larvas “D” (longitud 144 µm) y pedivéliger (longitud 330 µm) varió entre 0.44 y 6.59 µg org⁻¹ respectivamente, mientras que el peso orgánico varió entre 0.18 y 2.28 µg org⁻¹ respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de peso seco (PS) y peso orgánico (PO) obtenidos durante el desarrollo larvario de *P. globosa*.

Talla (µm)	PS (µg org ⁻¹)	PO (µg org ⁻¹)
144	0.44±0.06	0.18±0.01
237	1.40±0.02	0.65±0.01
291	2.47±0.14	1.17±0.17
302	5.83±0.93	2.28±0.28
330	6.59±0.48	2.77±0.11

6.2.2 Tasas de aclaramiento e ingestión.

Las larvas de *P. globosa* exhibieron una disminución de su tasa de aclaramiento (TA) en proporción inversa al aumento de la concentración de microalgas, independientemente del estadio de desarrollo (Fig. 5). La TA exhibida por larvas de charnela recta (144 μm) varió entre 0.27 cuando se expusieron a la concentración más alta de microalgas (300 cel μl^{-1}) y 1.46 $\mu\text{l h}^{-1}$ a la concentración más baja (50 cel μl^{-1}). La TA del estadio más avanzado de desarrollo larval, las larvas pedivéliger (330 μm), varió entre 15 y 59 $\mu\text{l h}^{-1}$. En contraste, la tasa de ingestión (TI) de todos los estadios larvales de *P. globosa* aumentó proporcionalmente con la concentración de microalgas, hasta la concentración de 200 cel μl^{-1} . A la concentración más alta (300 cel μl^{-1}) la TI alcanzó valores asintóticos o disminuyó, excepto en la fase umbada inicial (237 μm) y umbada intermedia (291 μm) donde se observó un aumento lineal a lo largo de todo el intervalo de concentraciones.

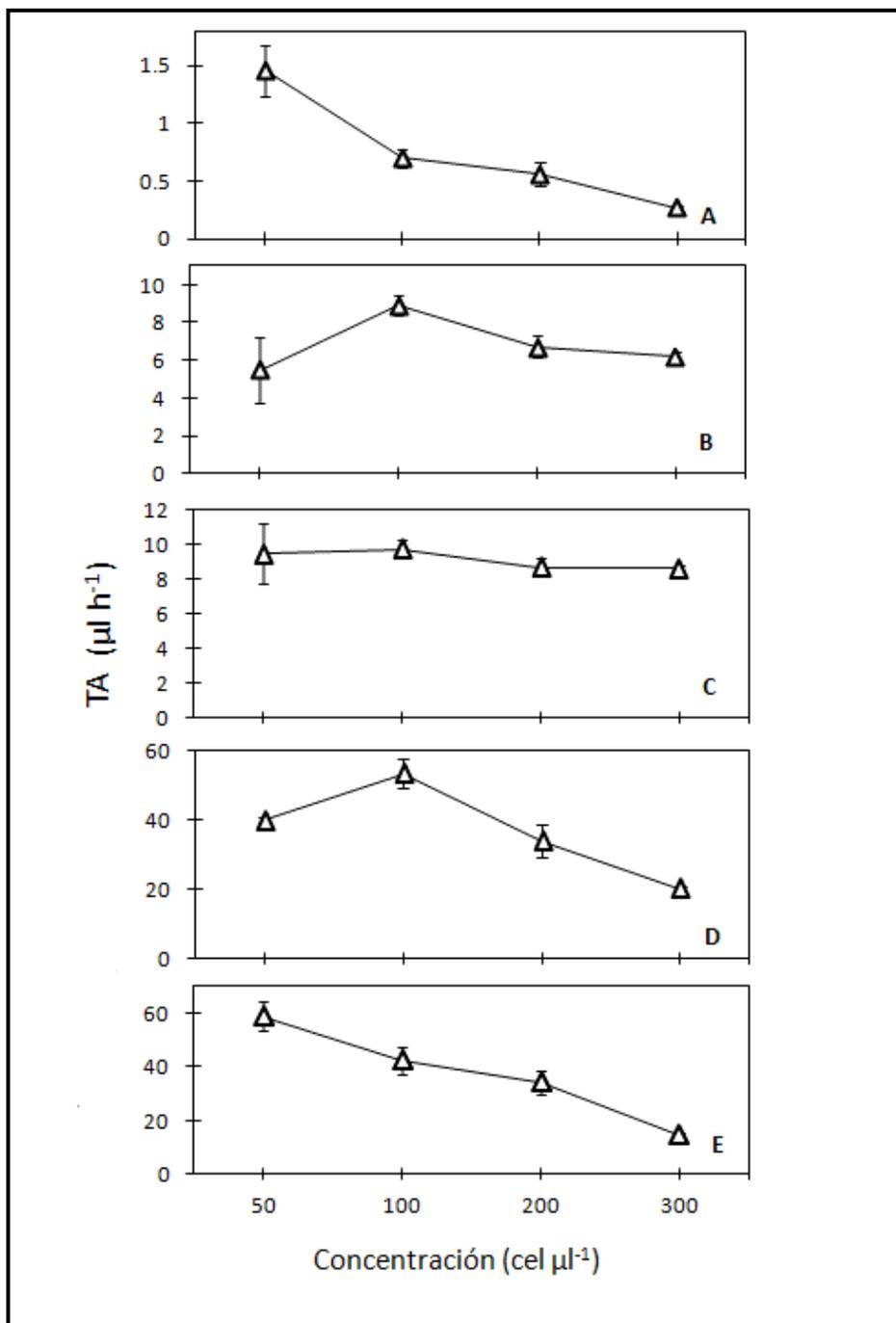


Fig. 5 Tasas de aclaramiento en 4 estadios larvales de *P. globosa*: A=larva de Charnela recta de 144 μm , B= umbada temprana de 237 μm , C=umbada intermedia de 291 μm , D=umbada tardía de 302 μm y E=Pediveliger de 330 μm .

Tanto las larvas "D" como las premetamórficas inhibieron su TI (Fig. 6).

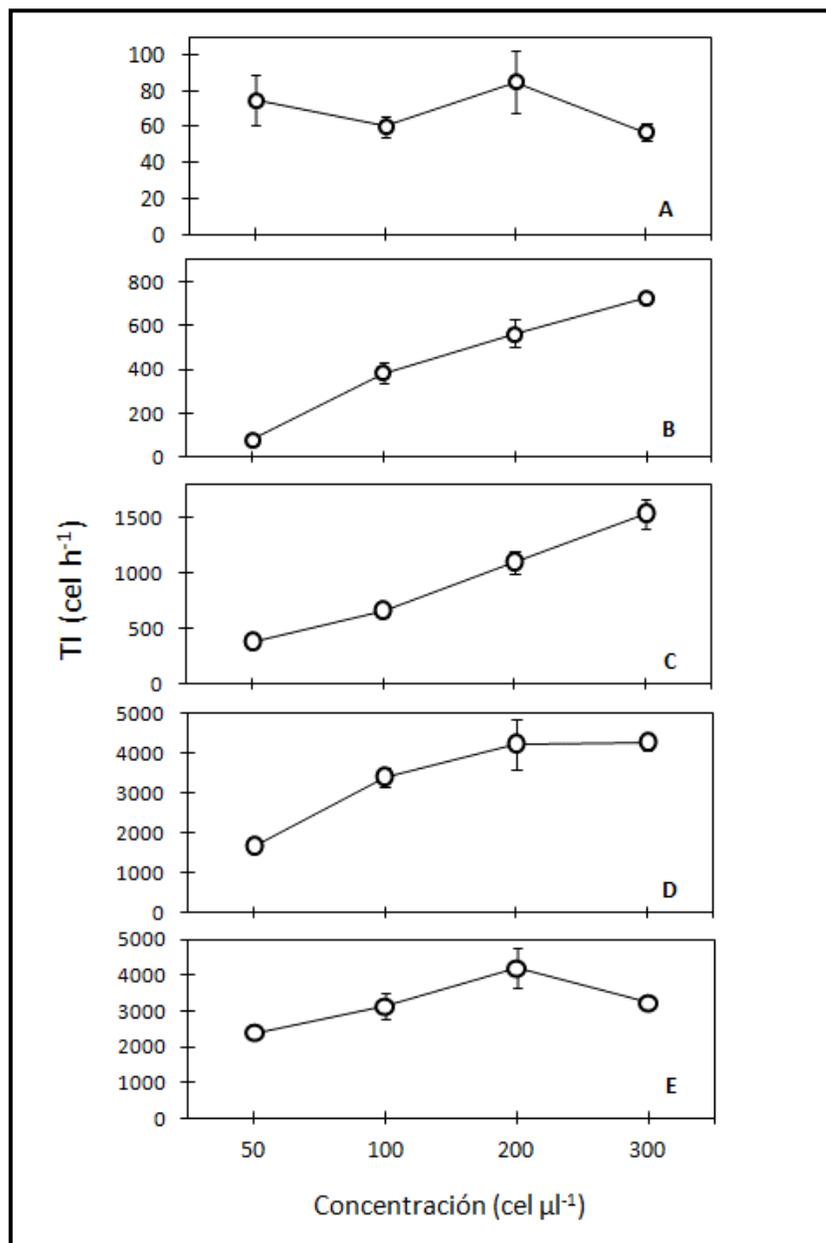


Fig. 6. Tasas de ingestión en 4 estadios larvales de *P. globosa*: A=larva de charnela recta de 144 μm , B= umbada temprana de 237 μm , C=umbada intermedia de 291 μm , D=umbada tardía de 302 μm y E=pediveliger de 330 μm .

También se observó que larvas de charnela recta (144 μm) aumentaron su TI hasta 40 - 50 veces más al llegar a la talla de 330 μm (2,382 – 4,212 cel h^{-1}).

Tabla 4. Ecuaciones alométricas de la TA ($\mu\text{l h}^{-1}$) y la TI (cel h^{-1}) en larvas de *P. globosa* sometidas a distintas concentraciones de microalgas. C= concentración de células ($\text{cel } \mu\text{l}^{-1}$).

C	a	B	r^2
TA = aPO ^b			
50	1.06	1.34	0.96
100	11.0	1.54	0.96
200	8.5	1.52	0.97
300	5.5	1.50	0.90
TI = aPO ^b			
50	398.1	1.36	0.83
100	724.4	1.52	0.98
200	1000.0	1.49	0.99
300	1000.0	1.55	0.97

7. DISCUSIÓN

Uno de los aspectos relevantes del presente estudio fue el hecho de que *P. globosa* exhibiera un período larval relativamente más corto (13 - 14 días), una TCB más alta ($19.4 \pm 1.0 \mu\text{m dia}^{-1}$) y una talla de metamorfosis intermedia (332 – 347 μm) entre las especies de su mismo género (Tabla 5). Lo anterior indica que *P. globosa* es la especie del género *Panopea* con mayor tasa de crecimiento larval, lo cual es ventajoso desde el punto de vista acuacultural. La especie *P. zelandica* (Gribben, 2003) también presenta un tiempo larval corto (16 días), pero su tasa de crecimiento ($10 \mu\text{m d}^{-1}$) y talla de metamorfosis (250 μm) es menor que la de *P. globosa*. Asimismo, la almeja del Pacífico, *P. generosa*, es la especie cuyas larvas exhiben la menor tasa de crecimiento reportada hasta ahora en el género *Panopea* (Tabla 5) y también la que presenta la mayor talla de metamorfosis y el mayor período larval (47 d, Goodwin *et al*, 1979). Estudios recientes realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos de UABC a la misma temperatura que la utilizada por Goodwin y colaboradores (1979) mostraron que la duración del período larval de *P. generosa* varía consistentemente entre 20 y 25 días (García-Esquivel, Z., com. per., Instituto de Investigaciones Oceanológicas UABC). Aún así, sigue siendo comparativamente mayor que el de *P. globosa*.

Por otra parte, y a pesar de haber registrado dos corridas con sobrevivencias del 20%, fue evidente que *P. globosa* presentó un alto porcentaje de sobrevivencia larval

(50 %). Este valor se encuentra dentro del rango promedio de altas sobrevivencias (50-70%) que se presenta en ostras y almejas (Helm *et al*, 2006), lo que resulta en un rendimiento aceptable para laboratorios de producción de semilla.

Tabla 5. Comparación de la duración del periodo larval (PL), tasa de crecimiento bruto (TCB) y talla de metamorfosis (TM) en especies del genero *Panopea*; T= temperatura de cultivo larval.

Especie	T (°C)	PL (días)	TC ($\mu\text{m dia}^{-1}$)	TM (μm)	Autor
<i>P. globosa</i>	22	13-14	19.45	332-347	Este estudio
<i>P. zelandica</i>	17	16	10.17	250	Gribben, 2003
<i>P. generosa</i>	14	47	5.6	381	Goodwin <i>et al.</i> , 1979
"	17	30	N/D	377	"

En relación a las tasas fisiológicas evaluadas, se pudo observar que el patrón de respuesta de las TA exhibido por las larvas de *P. globosa* coincidió con el comportamiento típico reportado para moluscos bivalvos. Así, los organismos redujeron sus TA en proporción al aumento de la concentración de alimento, independientemente de la talla larval. Este patrón ya ha sido reportado con anterioridad por otros investigadores en larvas de moluscos bivalvos como *Crassostrea gigas* (Gerdes, 1983), *Ostrea edulis* (Beiras *et al*, 1994), *Mytilus edulis* (Sprung, 1984),

Ruditapes decussatus (Perez-Camacho *et al*, 1994) y *Patinopecten yessoensis* (MacDonald, 1988). Dichos organismos han sido expuestos a amplios rangos de concentración de alimento (5 a 300 cel μl^{-1}) y se observa que tienen la capacidad de regular el volumen de agua clareado con el fin de obtener una ingestión óptima. Es importante notar que en el presente estudio las larvas de *P. globosa* comenzaron a regular su TA aún a las concentraciones más bajas que se utilizaron (50 y 100 cel μl^{-1}), lo que sugiere que dichas concentraciones fueron suficientemente altas como para mantener optimizadas las tasas de ingestión.

Los resultados del presente estudio mostraron que todos los estadios larvales de *P. globosa* aumentaron su TI al incrementar la concentración del alimento, llegando a un límite de ingesta a las 200 cel μl^{-1} . A concentraciones mayores la TI alcanzó el máximo o fue inhibida, excepto en la umbada inicial (237 μm) y umbada intermedia (291 μm), donde la TI aumentó constantemente. Lo anterior sugiere que las larvas llegaron a su máxima capacidad gástrica al alcanzar las 200 cel μl^{-1} . Por otra parte, la reducción de la TI exhibida por las larvas premetamórficas (330 μm) sugieren una respuesta fisiológica en preparación para la metamorfosis. Estudios anteriores han encontrado que las larvas de la almeja *Ruditapes decussatus* exhibieron máximas TI a las 200 cel μl^{-1} , y dicho comportamiento fue interpretado como un reflejo de la interferencia de las partículas a altas concentraciones lo cual afectaría la eficiencia de captura de las mismas (Perez-Camacho *et al*, 1994). El concepto de máxima capacidad

gástrica (Navarro *et al*, 1994) está relacionado con el concepto de tiempo de paso expuesto anteriormente por Bayne (1983), en el sentido de que la TI no solo depende de la TA, concentración del alimento y del tamaño de partícula, sino también de la tasa a la cual la tripa larval es evacuada, lo cual depende a su vez del grado de llenado y el tiempo de paso.

En comparación con otras larvas de grupos representativos de moluscos cuya TI se ha estudiado en el laboratorio, se puede concluir que *P. globosa* es una de las especies que ingieren alimento eficientemente en un amplio intervalo de concentraciones (Tabla 6). Al comparar la TI de larvas de charnela recta (“D”) expuestas a 200 cel μl^{-1} , se encontró que *P. globosa* tiene una menor TI (85 cel h^{-1}) que *O. edulis* (457 cel h^{-1}) en el mismo estadio larval (Tabla 6). Dichas diferencias probablemente se deban a las diferencias de talla, ya que las larvas “D” de *O. edulis* son más grandes (200 μm). No obstante las larvas “D” de la almeja *R. decussatus* (108 μm) exhiben TI similares a la de *P. globosa* del mismo estadio de desarrollo (144 μm , Tabla 6). Otro de los estadios importantes es la larva pediveliger, en esta fase *P. globosa* mostró una TI (4,212 cel h^{-1}) que es aproximadamente 5 veces superior a los valores de exhibidos por larvas pediveliger del grupo Ostreidae (*C. gigas*, *O. edulis*), y aproximadamente 10 veces mayor que las larvas de moluscos de las familias Mytilidae, Veneridae, y Pectinidae (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de TI exhibidos por estadios larvales selectos de especies representativas de moluscos bivalvos alimentados con la microflagelada *I. galbana* clon T-ISO. Los valores de TI son los máximos reportados para cada especie a la concentración indicada. T= temperatura, C= concentración de células, TI= tasa de ingestión. Los estadios larvales referidos son: ChaR= charnela recta, UmT= umbada temprana, UmF= umbada tardía y Pe= pediveliger.

Familia y especie	Estadio	Talla (µm)	T (°C)	C (cel µl ⁻¹)	TI (cel h ⁻¹)	Autor
Hiatellidae	ChaR	144	23	200	85	Este estudio
<i>Panopea globosa</i>	UmT	237			565	
	UmF	302			4,221	
	Pe	330			4,212	
Ostreidae	UmT	114	20	100	295	Gerdes, 1983
<i>Crassostrea gigas</i>	UmF	177			1,088	
						Beiras et al,
Ostreidae	ChaR	200	20	200	457	1994
<i>Ostrea edulis</i>	PE	283			1,276	
Mytilidae	UmF	141	12	5	69*	Sprung, 1984
<i>Mytilus edulis</i>	Pe	289			363	

Veneridae	ChaR	108	19	200	100	Perez-Camacho <i>et al</i> , 1994
<i>Ruditapes decussatus</i>	Pe	228			600	
						MacDonald, 1988
Pectinidae	ChaR	114	14	15	133	
<i>Patinopecten</i> <i>yessoensis</i>	Pe	240			600	

Lo anterior sugiere que *P. globosa* mantiene un metabolismo comparativamente mayor que las larvas de otros moluscos, lo cual se refleja en una talla de metamorfosis relativamente grande y un rápido crecimiento y asentamiento.

8. REFERENCIAS

Aragón-Noriega E. A., Chavez-Villalba J., Gribben P. E., Alcántara-Razo E. Maeda-Martínez A. N., Arambula-Pujol E. M., García- Juárez A. R., Maldonado-Amparo R. (2007). Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (BIVALVIA: HIATELLIDAE) in the central Gulf of California, *Journal Shellfish Research*, 26:423–431.

Baker S. M., Mann R. (1994). Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 181: 239-253.

Bayne B. L. (1983). Physiological Ecology of Marine Molluscan Larvae. *The Mollusca*, 3: 299–343.

Bayne B. L. (1965). Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2: 1-47.

Beiras R., Perez-Camacho A. (1994). Influence of food concentration on the physiological energetics and growth of *Ostrea edulis* larvae. *Marine Biology*, 120: 427-435.

Bruce J. R., Knight M., Parke M. W. (1939). The rearing of the oyster larvae on algal diet. *Journal Marine Biology Association of the United Kingdom*, 24: 337-374.

Calderón-Aguilera L. E., Aragón-Noriega E. A., Reyes-Bonilla H., Paniagua-Chavez C. G., Romo-Curiel A. E., Moreno Rivera V. M. (2010). Reproduction of the Cortes geoduck *Panopea globosa* (bivalvia: hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. *Journal Shellfish Research*, 26: 135-141.

Coughlan J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*, 2: 356-358.

MacDonald B. A. (1988). Physiological energetics of japanese scallop *Patinopecten yessoensis* larvae. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 119: 155-170.

Perez-Camacho A., Beiras R., Albentosa M. (1994). Effects of algal concentration and body size on the ingestion rates of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) veliger larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 115: 87-92.

Feldman K., Vadalopas B., Armstrong D., Friedman C., Hilborn R., Naish K., Orensanz J., Valero J., Ruesink J., Suhrbier A., Christy A., Cheney D., Davis J. (2004). Comprehensive literature review and synopsis of issues relating to geoduck (*Panopea abrupta*) ecology and aquaculture production. Washington State Department of Natural Resources. 134pp.

Galtsoff P. S. (1964). The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bulletin, 64: 1-480.

Gerdes D. (1983). The Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Part. I. feeding behavior of larvae and adults. Aquaculture, 31: 195-219.

Goodwin L., Shaul W., Budd C. (1974). Larval development of the geoduck clam (*PANOPE GENEROSA*, GOULD). Proceedings of the National Shellfisheries Association, 69:73-76.

Gribben P. E., Hay B. E. (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, 184 pp.

Hickman R. W., Gruffydd LL. D. (1971). The histology of the larva of *Ostrea edulis* during metamorphosis. In: Crisp, D.J. (ed.), Fourth European Marine Biology Symposium, Cambridge University Press, New York, pp. 282-294.

Navarro E., Iglesias J. I. P., Ortega M. M., Larretxea X. (1994). The basis for a functional response to variable food quantity and quality in Cockles *Cerastoderma edule* (Bivalvia, Cardiidae). Physiological Zoology, 67: 468-496.

Paffenhofer G. A. (1971). Grazing and ingestion rates of nauplii, copepodids and adults of the marine planktonic copepod *Calanus helgolandicus*. *Marine Biology*, 11: 286-298.

Pechenik J. A., Fisher N. S. (1979). Feeding assimilation and growth of mud snail larvae, *Nassarius obsoletus* (say), on three different algal diets. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 38: 57-80.

Sastry A. N. (1965). The development and external morphology of pelagic larval and post-larval stages of the Bay scallop, *Aequipecten irradians concentricus* Say, reared in the laboratory. *Bulletin of Marine Science*, 15: 417-435.

Sprung M. (1984). Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). II. Food intake. *Marine Ecology Progress Series*, 17: 295-305.

Winter J. E. (1978). A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture system. *Aquaculture*, 13: 1-33.