

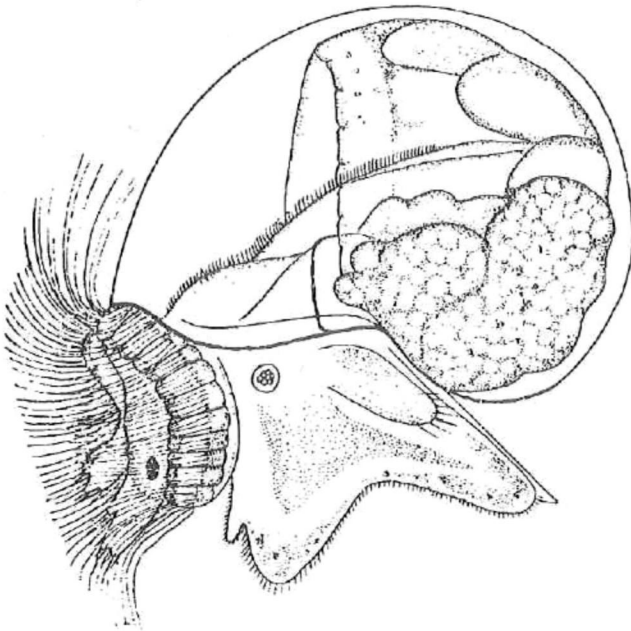


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones
Oceanológicas

El efecto de la edad de la larva del
abulón *Haliotis rufescens* en la inducción
a su metamorfosis



TESIS
Que para obtener el
grado de
Maestro en Ciencias
en Oceanografía Costera
presenta

Alfredo Ernesto Salas Garza

Ensenada, B.C. abril de 1995


El efecto de la edad de la larva del abulón *Haliotis rufescens* en la inducción a su metamorfosis

**TESIS
QUE PRESENTA:**

Alfredo Ernesto Salas Garza



**Dr. José Antonio Zertuche González
Presidente del Jurado**



**Dra. María Teresa Viana Castrillón
Sinodal**

**M.C. Rafael Solana Sansores
Sinodal**

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIALES Y METODOS	11
4.1. Diseño Experimental	11
4.2. El modelo lineal factorial	11
4.3. Desove.	14
4.4. Fertilización	14
4.5. Cultivo de larvas	15
4.6. Metamorfosis	16
4.7. Desarrollo de la rádula	18
4.8. Crecimiento	18
4.9. Supervivencia	19
4.10. Análisis Estadístico	19
5. RESULTADOS	22
5.1. Metamorfosis	22
5.2. Desarrollo de la rádula	24
5.3. Crecimiento	24
5.4. Supervivencia	32
6. DISCUSION	36
6.1. Metamorfosis	36
6.2. Desarrollo de la rádula	44
6.3. Crecimiento	46
6.4. Supervivencia	47
7. CONCLUSIONES	51
8. LITERATURA CITADA	52

ANEXO	59
Tabla I.-ANDEVA de dos vías, del experimento de inducción a la metamorfosis de larvas de diferentes edades (7-12 días), en el que se aplicaron como inductores; GABA y diatomeas bentónicas.($\alpha= 0.05$).	60
Tabla II.-ANDEVA, y prueba de contrastes de Scheffe, de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con GABA, de larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha= 0.05$).	60
Tabla III.-ANDEVA, y prueba de contrastes de Scheffe, de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con diatomeas bentónicas, de larvas de diferentes edades.($\alpha= 0.05$).	61
Tabla IV.-ANDEVA y prueba de contrastes de Scheffe de las conchas peristomales presentes 24 horas después de inducir a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días).($\alpha= 0.05$).	62
Tabla V.-Ajuste al Modelo Lineal y Multiplicativo de los valores de metamorfosis de larvas de diferentes edades (7-12 días), inducidas con GABA.	63
Tabla VI.-ANDEVA y prueba de contrastes de Scheffe de las conchas peristomales presentes 24 horas después de inducir a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días).($\alpha=0.05$)	64
Tabla VII.- Regresión lineal para los datos de longitud de poslarvas-juveniles de 9, 45 y 63 días de edad, que se obtuvieron al inducir a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días). (N = 108 organismos).	65
Tabla VIII.- Comparación de pendientes de las regresiones del crecimiento de las poslarvas-juveniles, de 9, 45 y 63 días de edad, que se obtuvieron al inducir a la metamorfosis, con GABA, a larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	65

Tabla IX.- Regresión lineal de los datos de longitud de poslarvas-juveniles de 9, 45 y 63 días de edad, y obtenidas de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con diatomeas bentónicas (N = 108 organismos).	66
Tabla X.- Comparación de pendientes de las regresiones de crecimiento de las poslarvas-juveniles, obtenidas de larvas de diferentes edades (7-12 días), inducidas a la metamorfosis con diatomes bentónicas. ($\alpha=0.05$).	66
Tabla XI.- Longitud promedio y Tasas de crecimiento de poslarvas-juveniles, obtenidos después de haber inducido a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días),	67
Tabla XII.- Longitud promedio y Tasas de crecimiento de poslarvas-juveniles, obtenidos después de haber inducido a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días).	67
Tabla XIII.- ANDEVA del crecimiento a los 9, 45 y 63 días, de poslarvas-juveniles, obtenidos de la inducción a la metamorfosis con GABA, de larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	67
Tabla XIV.- ANDEVA del crecimiento a los 9, 45 y 63 días, de poslarvas-juveniles, obtenidos de la inducción a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, de larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	68
Tabla XV.- Prueba t Student en la comparación del crecimiento promedio de juveniles obtenidos con larvas de diferentes edades (7-12 días), inducidas a la metamorfosis con los inductores; GABA y diatomeas bentónicas.	70
Tabla XVI.- Supervivencia de poslarvas-juveniles, obtenidos de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con GABA	71
Tabla XVII.- Supervivencia de poslarvas-juveniles, obtenidos de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con diatomeas bentónicas.	71

Tabla XVIII.-ANDEVA y prueba de contrastes de Scheffe de la sobrevivencia de las poslarvas, después de 29 días de haber inducido a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	72
Tabla XIX.-ANDEVA de la sobrevivencia de las poslarvas después de 29 días de haber inducido a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	73
Tabla XX.-ANDEVA de la sobrevivencia de las poslarvas, después de 45 y 63 días de haber inducido a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	73
Tabla XXI.- ANDEVA de la sobrevivencia de las poslarvas, después de 45 y 63 días de haber inducido a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).	74

RESUMEN

Para conocer el efecto de la edad de las larvas en la inducción a su metamorfosis, se indujeron larvas de *Haliotis rufescens* de 7, 8, 9, 10, 11, y 12 días de edad, con dos inductores; diatomeas bentónicas y GABA. Se examinaron rádulas de las larvas en cada ocasión, para analizar su posible uso como indicador del estadio de "competencia", y se observó el crecimiento y la sobrevivencia de los juveniles obtenidos, durante dos meses. Los valores de metamorfosis fueron diferentes con la edad de la larva al momento de la inducción, lo cual fue más evidente con GABA. El mayor porcentaje de metamorfosis fue a diferente edad para cada inductor. Además, el GABA fue mejor inductor, actuó más rápido y más sincrónico que las diatomeas bentónicas. A los dos meses la longitud promedio fue ligeramente superior y más homogénea en los juveniles obtenidos con GABA (1904µm) que con diatomeas bentónicas (1780µm). La sobrevivencia fue menor durante el primer mes, con valores al final del estudio de 3.98% de los juveniles obtenidos con GABA y de 4.5% con diatomeas bentónicas. El número de hileras de dientes en la rádula se incrementó linealmente con la edad de la larva ($R^2=88\%$), presentando 10 hileras cuando la metamorfosis fue superior al 90%, con GABA. En este caso se considera el número de hileras de dientes en la rádula un mejor indicador de la "competencia" de las larvas que las ramificaciones de los tentáculos cefálicos, para obtener mayores tasas de metamorfosis.

1.. INTRODUCCION

El abulón *Haliotis* spp es un molusco bentónico característico de aguas templadas. Su ciclo de vida se inicia con la fertilización externa de los óvulos y una posterior eclosión a larva planctónica, la cual después empieza su proceso de asentamiento al fondo marino, para dar lugar a la metamorfosis y así, iniciar su fase bentónica. Estos organismos viven sobre sustratos rocosos. Durante su etapa juvenil temprana se alimentan de microalgas y posteriormente de macroalgas. Presentan un fototactismo negativo, por lo que su habitat común son las grietas, cuevas y superficies cubiertas. Su crecimiento es lento, aunque varía con la especie, aproximadamente en 6-8 años alcanza los 12 cm. Además, tiene poco movimiento, lo que facilita su captura, y sus poblaciones, debida a su lenta recuperación, son muy sensibles a la sobreexplotación.

Dada la importancia del abulón como recurso pesquero, de alto precio en el mercado internacional y a la sobreexplotación de sus poblaciones naturales, la mayoría de los países que se dedican a su extracción, han dedicado un gran esfuerzo a su cultivo. Japón inició actividades relacionadas con su cultivo hace casi 40 años (Grant, 1931). Esta actividad, se sustenta en la producción de juveniles en el laboratorio, ya que su captación en el medio natural es muy pobre e ineficiente.

En abulón, como en otros moluscos, el estudio específico del comportamiento de las larvas y su etapa de asentamiento y metamorfosis, son fundamentales para la obtención de semilla por medio de colectores en el medio natural o en el laboratorio.

Aún, son pocos los estudios sobre la metamorfosis en larvas de abulón. Los resultados obtenidos con los diferentes inductores, proporcionan resultados muy variables, posiblemente debido a que su aplicación se lleva a cabo en diferentes estados de sensibilidad de la larva a la inducción, la cual varía con la edad, de un día a otro. En este trabajo, se estudió en *Haliotis rufescens* la relación de la edad de la larva con la metamorfosis obtenida con dos inductores. Como inductores, se utilizaron; las diatomeas

bentónicas, que son de uso mundial en los laboratorios de producción y el ácido gama-aminobutírico (GABA).

2.. ANTECEDENTES

La larva de abulón es considerada lecitotrófica, ya que que no necesita obtener su alimento del medio ambiente durante esa etapa, pues hace uso de sus propias reservas (Jaekle y Manahao, 1989). Después del asentamiento, al encontrar condiciones favorables, inicia su proceso de metamorfosis para llegar posteriormente a su estadio juvenil. Las larvas de abulón pueden retrasar su metamorfosis si no encuentra un sustrato adecuado. Esta capacidad de retraso ha sido encontrada para una gran cantidad de organismos marinos, algunos de los cuales pueden llegar a prolongar su vida larvaria hasta un año (Scheltema, 1971). Morse (1984), señala que en ausencia de inductores, la larva de *H. rufescens* puede posponer el asentamiento y sobrevivir por más de tres semanas.

En el cultivo de abulón *Haliotis* spp, la inducción al asentamiento y metamorfosis de las larvas y su primer mes de vida bentónica, es la etapa más crítica (Grant, 1981). Su etapa larvaria es por lo general de 5 a 8 días, dependiendo de la temperatura a la cual se desarrolla y la sobrevivencia puede ser mayor del 90%. Sin embargo, posteriormente, en la transición de larva véliger a juvenil bentónico, la sobrevivencia puede disminuir a menos del 10% (Ebert y Houk, 1984).

Las causas de mortalidad en esa etapa pueden ser diversas, como las bacterias del tipo *Vibrio* que pueden estar están presentes en los cultivos de diatomeas de los cuales se alimentan (Elston y Lockwood, 1983), o bien de tipo genético u oogénico (Morse et al., 1979a; Leighton, 1985), que repercuten en la calidad de la larva y poslarvas obtenidas. También, Imai (1967), atribuye la alta mortalidad que se observa durante y posterior a el asentamiento, a problemas relacionados con una deficiente nutrición. Sin embargo, Leighton (1977) y Morse *et al.*(1979a), consideran que esto no es suficiente para explicar la elevada mortalidad ocurrida durante esa etapa. Kohn (1983), y Garland *et al.*, (1985), señalan la importancia del valor nutricional de diatomeas y microorganismos, en poslarvas, para tener éxito en el reclutamiento de los gasterópodos y el abulón respectivamente.

También se han obtenido evidencias experimentales de que la mortalidad en condiciones de laboratorio y en ausencia de un inductor específico, es provocado por un crecimiento poblacional desmedido de las bacterias, que provocan una mortalidad poslarval (Leighton, 1977; Morse *et al.*, 1979b). Estos autores, también señalan, que como consecuencia de lo anterior, puede ocurrir la aparición de protozoarios ciliados en el cultivo, que completan la digestión de los abulones moribundos y que puede provocar la pérdida total del cultivo. Este último autor considera que la mortalidad poslarval en las especies de *Haliotis* resulta en parte, del retraso del desarrollo normal, y sugiere que las sustancias requeridas morfogénicamente de manera natural para la inducción, pueden estar ausentes en los sistemas de cultivos intensivos que se utilizan. De manera que, para superar esta deficiencia, se requiere de la aplicación de un inductor adecuado. Otro aspecto que debe ser considerado, es la edad de la larva en el momento de la inducción ya que también depende de esta (Barlow, 1990; Hahn, 1989). Por lo tanto, la nutrición de las poslarvas, el inductor y la edad de las larvas al momento de la inducción a la metamorfosis son factores que es necesario conocer más para saber como y cuales son sus efectos en esta etapa.

Como es posible obtener más de un millón de huevos de una sola hembra, algunos investigadores no parecen darle gran importancia a este hecho. Sin embargo, sí preocupa a los productores que requieren de producciones elevadas de semilla. En Japón hay laboratorios que producen más de 2,000,000 de juveniles anualmente, y las altas sobrevivencias proporcionan una mayor eficiencia que permite bajar los costos de producción (Kan-no, 1975).

Debido a la sobrexplotación a que ha sido sometido el abulón, en México se consideró la acuicultura como una alternativa. A partir de 1984 iniciaron operaciones las dos primeras granjas de producción de semilla, la cual se destinaría al repoblamiento de los bancos naturales. Los laboratorios comerciales y/o granjas de abulón, que operan en Bahía

Tortugas, La Bocana y Punta Eugenia, en Baja California Sur, tienen una mortalidad superior al 99% de las poslarvas durante la metamorfosis y los días posteriores a ésta. Su producción anual promedio ha sido muy baja, de 7,000 a 20,000 juveniles por laboratorio, a pesar de que algunos de éstos tienen cinco y hasta diez años en operación. Esta es la principal causa por la que no se ha desarrollado el cultivo de abulón en el país (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992). La única granja de abulón que opera a gran escala desde 1993, es privada y se encuentra operando en la Isla Todos Santos. En el inicio compraron la semilla de abulón rojo *H. rufescens* (600,000 juveniles), a granjas de California, y recientemente empezaron a producir su propia semilla en un laboratorio ubicado en el Ejido Eréndira B.C.

Las larvas de abulón, cuando ya han completado su desarrollo larval, son competentes para el asentamiento y es posible observar ciertas características morfológicas que así lo determinan. La larva presenta cuatro lóbulos o ramificaciones en los tentáculos cefálicos, el pie está más desarrollado y le permite reptar sobre el sustrato y propulsarse con la ayuda de los cilios (Seki y Kan-no, 1981; Ebert y Houk, 1984). Las larvas competentes alternan el nado con la reptación, "probando" los diferentes sustratos hasta que encuentran el adecuado, luego empieza la metamorfosis. Inicialmente las larvas pasan más tiempo nadando que reptando, invirtiéndose paulatinamente este proceso (Morse *et al.*, 1980). Dicho comportamiento asegura una gran especificidad en la inducción al asentamiento, protegiendo a las larvas de un microhabitat inadecuado, ya que iniciada la metamorfosis con la pérdida de los cilios el proceso es irreversible. La iniciación de la metamorfosis se puede observar cuando se desprende el vélum (compuesto de 24 células ciliares) y se inicia la formación de la concha peristomal, que es la precursora de la concha del estado adulto. El asentamiento y la metamorfosis generalmente ocurren como respuesta ante un estímulo externo. Existe controversia entre autores para definir la metamorfosis, que de acuerdo

con Scheltema (1974), Chia y Koss (1978), y Chia (1989), es un cambio ontogénico que implica transformaciones morfogénicas irreversibles.

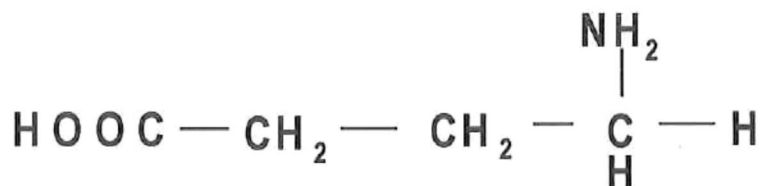
Los métodos más utilizados para inducir al asentamiento y metamorfosis son las diatomeas bentónicas y el mucus de abulón. Estos han sido tradicionalmente utilizados en países como; Japón, Corea, Taiwán, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelandia, Francia (Hahn, 1989) y México (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992). Existe otro método, la aplicación del ácido gama-aminobutírico (GABA), que empieza a ser usado cada vez más por algunas granjas de abulón en México y Estados Unidos, pero que aún se cuestionan sus alcances.

Morse *et al.* (1979a, 1979b) y Morse (1984), sugieren que las diatomeas no actúan por sí solas como estímulo, sino que bacterias asociadas a estas son las que provocan la inducción mediante la liberación de GABA o ácido glutámico (precursor del GABA) a través de su acción con el detritus y otras fuentes de materia orgánica. La importancia y el efecto de las bacterias sobre las larvas es poco entendido en términos de su influencia al asentamiento y metamorfosis (Elston y Lockwood, 1983). En Nueva Zelandia los recipientes que contienen los cultivos de diatomeas se dejan sin cambio de agua por un día para permitir la proliferación de bacterias en el medio, un día antes de la inducción al asentamiento, ya que de esta manera se obtienen mejores resultados en la metamorfosis (Tong Y Moss, 1992). Las bacterias se han considerado como un complemento alimenticio importante de los abulones, principalmente en su vida bentónica inicial (Cropp, 1989).

El mucus, como inductor es comunmente utilizado en los países asiáticos (Grant, 1981; Seki, 1980; Seki y Kan-no, 1981). Su aplicación consiste en la colonización previa por diatomeas bentónicas en los recipientes o placas de asentamiento, y sobre las cuales se dejan reptar y pastorear abulones juveniles por 24 o 48 horas, antes al asentamiento (Seki, 1980). El mecanismo de acción es desconocido y se sugiere que el mucus o alguno de sus

componentes químicos actúa como inductor. La larva al parecer detecta el mucus por contacto con sus tentáculos cefálicos.

Juveniles de abulón de reciente asentamiento, se han encontrado asociados con algas coralinas incrustantes, en más alta proporción que en ambientes similares con ese tipo de algas ausentes (Saito, 1981; Shepherd y Turner, 1985). En el medio natural el estímulo ambiental que desencadena el proceso de metamorfosis, en el abulón rojo *H. rufescens*, se encuentra presente en esas algas rojas incrustantes (Morse y Morse, 1984). En el laboratorio, Morse *et al.* (1979a, 1980), utilizaron GABA como inductor ya que mimetiza la acción del inductor natural. Se indujeron al asentamiento larvas que respondieron rápidamente al estímulo. Se encontró que éste induce al asentamiento y metamorfosis de una manera rápida y sincrónica hasta en un 99%. El GABA es un aminoácido y un neurotransmisor que actúa en terminales presinápticas como inhibidor en el sistema nervioso de vertebrados (Levitan y Kaczmarek, 1991; Tofano, 1983). Como neurotransmisor actúa a través de dos tipos de receptores de membrana reconocidos como GABA_A y GABA_B (Chapman, *et al.*, 1993; McGeer y McGeer, 1993). De acuerdo con Chapman *et al.*, (1993), el primero actúa mediante la apertura de canales iónicos de Cl⁻ con los que se despolariza la membrana nerviosa y bloquea los potenciales de acción nerviosa y se inhibe la excitabilidad nerviosa. El segundo, modula los canales de Ca²⁺ y K⁺ mediante la interacción con segundos mensajeros celulares como las G proteínas o la adenilato ciclasa. El GABA se sintetiza a partir del ácido glutámico y su composición química se describe a continuación:



Experimentalmente se encontró que con GABA a mayor concentración 10^{-3} M el asentamiento en *H. rufescens*, fue del 100% en sólo siete minutos y a 10^{-6} M fue del 26 % después de 38 horas (Morse *et al.*, 1980). Concentraciones mayores de 10^{-6} M aplicadas por un tiempo prolongado inducen al asentamiento pero la metamorfosis es inhibida y los juveniles eventualmente mueren. Si se aplica prematuramente se inhibe el asentamiento. La concentración y el tiempo de exposición son críticos en su aplicación.

Los tres métodos descritos han demostrado su eficacia en la inducción a la metamorfosis. Sin embargo, la aplicación de GABA en larvas de una especie de abulón japonés *Haliotis discus hannai* provocó un comportamiento anormal, con la muerte subsecuente de las larvas (Akashige, *et al.*, 1981). Por otro lado, Morse *et al.*, (1979a), prueba que ninguna de las diatomeas bentónicas que son consumidas inicialmente por poslarvas, tales como *Cyclotella* spp, *Nitzschia* spp, *Tetraselmis* spp y *Cocconeis* spp indujeron al asentamiento de larvas. Esto fue cuestionado luego por otros autores (Ino, 1980; Ebert y Houk, 1984). En cambio, el GABA provoca un asentamiento y metamorfosis normal tanto en *H. rufescens* (Morse, 1979a; Searcy-Bernal *et al.*, 1992b), como en *H. corrugata* y *H. fulgens* (Searcy-Bernal *et al.*, 1992b). Estos resultados parecen contradecirse entre ellos. Sin embargo, puede concluirse que ambos métodos son capaces y efectivos para inducir al asentamiento y la diferencia entre resultados no necesariamente se deben únicamente a diferencias de especies.

La inducción al asentamiento y metamorfosis es un fenómeno crítico en la vida del abulón, por lo cual el mecanismo de inducción se considera que debe de ser muy específico. Aunque las técnicas usadas en cada estudio para probar repetidamente la inducción con diatomeas bentónicas y también el GABA parecen ser las mismas, hay probablemente diferencias muy sutiles, como pudieran ser: reactivos de diferentes compañías químicas, calidad del agua, edad de la larva examinada y otros que pudieran afectar los resultados (Hahn, 1989).

Ebert y Houk (1984), en su laboratorio, repitieron en cinco ocasiones la misma técnica de inducción con diatomeas bentónicas, en iguales condiciones, para obtener juveniles a partir de larvas, y en tres meses obtuvieron diferentes resultados en la sobrevivencia, desde 1.9% hasta 13.5%. El 90% de la mortalidad ocurrió durante el primer mes y la mitad de ésta durante la metamorfosis. Esto revela que el éxito del cultivo es muy variable, lo cual es común en los laboratorios comerciales. Si se considera que el período larvario de 6 a 8 días es corto, el inducir el asentamiento un día antes o un día después puede variar los resultados de manera importante, si la sensibilidad de la larva al inductor cambia con la edad o con su estadio de desarrollo. Hay evidencias que sustentan esta hipótesis.

Barlow (1990), utilizó GABA como inductor a los 7, 8, 9, 11 y 15 días de edad de la larva, la respuesta fue diferente en cada ocasión. La larva se consideró competente para el asentamiento el día 7, sin embargo sólo un 30% se metamorfizó y hasta el día 11 se obtuvo un 100% de metamorfosis. Lo anterior sugiere que a pesar de que la larva es competente para fijarse al sustrato, la competencia para metamorfosis se alcanza días después. Es posible que este estado sea el reflejo de otros cambios en el desarrollo de la larva, tales como la terminación del circuito neural mediante el cual responde al estímulo para la metamorfosis (Barlow, 1990). El experimento de este autor, se llevó a cabo a una temperatura controlada de 15°C, por lo que hablar de una edad para una mejor metamorfosis probablemente es válido para esa temperatura y no para otras. La sensibilidad de la larva al estímulo debe estar en función de su desarrollo (y no de la edad), el cual a su vez depende de la temperatura, ya que a mayor temperatura tendrá un desarrollo más rápido y será competente antes de los 11 días señalados. Larvas de *Haliotis sorenseni* se mostraron competentes para el asentamiento a los 7 días a una temperatura de 20°C, a los 8 días a 18°C y no ocurrió esto a 10°C (Leighton, 1972). Debido a que puede haber otros factores que en menor grado influyan en el desarrollo de la larva, como; la calidad del agua, estrés debido al manejo etc., sería de gran utilidad tener un indicador

del estado de desarrollo de las larvas que señale cuando realmente son competentes para el asentamiento y metamorfosis con las mejores posibilidades de éxito a cualquier temperatura que se haya realizado el cultivo. Una posibilidad es tomar como referencia o indicador la rádula de las larvas, las cuales durante sus últimos días de vida larvaria y su etapa de poslarva, aún está en desarrollo y se da un incremento en el número de hileras de dientes. En un laboratorio de Nueva Zelanda, además de observar el desarrollo de los tentáculos cefálicos se cuenta el número de hileras de dientes en las larvas y cuando tiene de siete a nueve hileras se considera que están competentes para el asentamiento (Tong Y Moss, 1992).

El efecto de usar uno u otro inductor, el estadio de desarrollo de la larva en el momento de la inducción, la conveniencia de usar uno u otro indicador para determinar la competencia de las larvas para ser inducidas a la metamorfosis, la variabilidad en los resultados obtenidos en un laboratorio al utilizar la misma rutina en la producción de semilla, son algunas de las interrogantes a las que se ha hecho referencia en este escrito.

3.. OBJETIVOS:

Los objetivos de este estudio son:

- 1) Establecer con larvas de diferentes edades de *H. rufescens*, su relación con la respuesta en la metamorfosis, con dos inductores, GABA y diatomeas bentónicas.
- 2) Establecer su momento óptimo a la metamorfosis con el desarrollo de la rádula y evaluar su utilización como indicador de competencia a la metamorfosis.
- 3) Evaluar los cultivos de poslarvas y juveniles obtenidos de las condiciones experimentales señaladas, por medio del crecimiento y la sobrevivencia.

4.. MATERIALES Y METODOS

Para determinar la relación de la edad de la larva en el momento de la inducción , con la metamorfosis obtenida, se indujeron a la metamorfosis larvas competentes, provenientes de un mismo cultivo, a las edades de 7, 8, 9, 10, 11 y 12 días. La inducción a la metamorfosis se realizó durante seis días, cada 24 horas y se utilizaron paralelamente dos inductores, diatomeas bentónicas y GABA, además del testigo, en el que se mantuvieron larvas en ausencia de inductores.

El estudio se llevó a cabo de enero a mayo de 1993 en el Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, en Ensenada.

4.1 Diseño Experimental

El modelo experimental utilizado fue de **dos factores fijos**, cumpliéndose las características de aleatoriedad y réplicas. Los factores fijos fueron la **edad** y los **inductores**, y el número de réplicas fueron tres en todos los casos.

4.2 El modelo lineal factorial (Montgomery, 1983):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

donde:

Y_{ijk} = Porcentaje de metamorfosis en la k-ésima réplica en el subgrupo representando el i-ésimo grupo del tratamiento A, y el j-ésimo grupo, del tratamiento B.

μ = Media poblacional.

α_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (edad de la larva).

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B (inductor).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción en el subgrupo representando el i-ésimo grupo del factor A y el j-ésimo grupo del factor B.

ε_{ijk} = es el error asociado con la k-ésima en el subgrupo. Los errores tienen una distribución normal, idénticamente distribuidos e independientes, con valor esperado de 0 y homoscedástico.

De manera esquemática, el diseño experimental que representa el modelo utilizado se muestra en la figura 1.

Los dos factores que se prueban con este modelo; los inductores y las edades de las larvas, son considerados como fijos, ya que fueron seleccionados previamente, es decir, sin pretender su elección al azar. Por lo tanto, partiendo de esto, la esperanza de cuadrados medios para cada uno de los factores, su interacción y el error, se expresa de la siguiente manera:

Esperanza de cuadrados medios, E (CM)

FV	E(CM)
Edad (A)	$\sigma^2 + b \sum i(\bar{y}_i - \bar{y})^2/a$
Inductor (B)	$\sigma^2 + a \sum j(\bar{y}_j - \bar{y})^2/b$
A X B	$\sigma^2 + (1/ab) \sum i \sum j (y_{ij} - \bar{y}_i)(y_{ij} - \bar{y}_j)$
Error	σ^2
En el mismo orden corresponden:	
	El efecto esperado de la Edad
	El efecto esperado del Inductor
	El efecto esperado de la Interacción
	El efecto esperado del Error

Para el modelo experimental planteado, se consideró adecuado emplear el análisis de varianza (ANDEVA), ya que es una prueba robusta, que opera bien aún con considerable

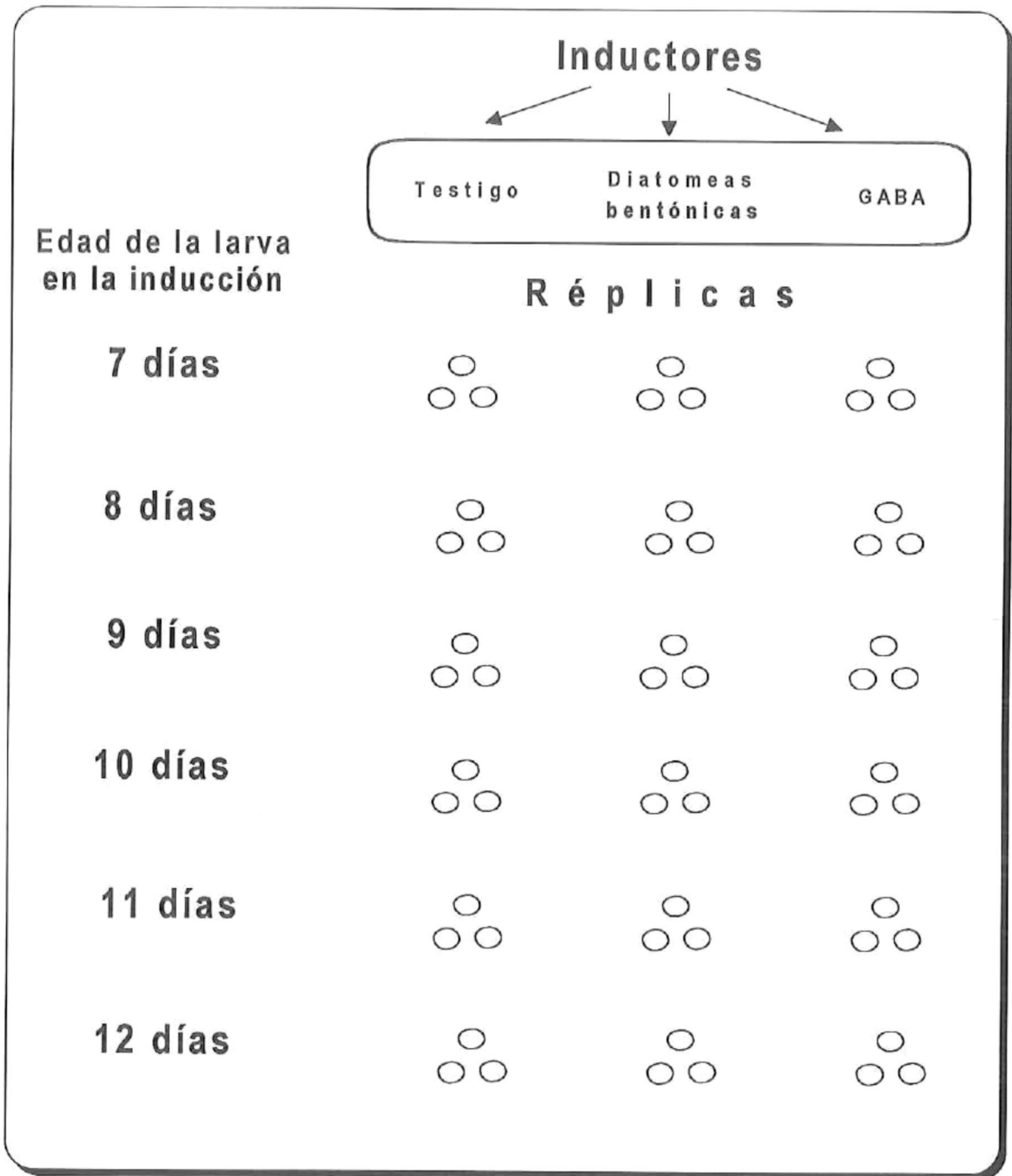


Figura 1.- Diseño experimental. Inducción a la metamorfosis de larvas de *H. rufescens* durante seis días. El primer día de inducción a la metamorfosis las larvas mostraban cuatro ramificaciones en los tentáculos cefálicos a la edad de 7 días.

heterogenidad de varianzas, siempre y cuando todas las n_i sean iguales o casi iguales. También es robusta con respecto a la suposición implícita de "poblaciones" normales, ya que solo es afectada ligeramente por desviaciones considerables de la normalidad, especialmente con incrementos de n .

4.3 Desove.

Se obtuvieron sementales de abulón rojo, *Haliotis rufescens* con promedio de 8.0 cm, en una granja de abulón en California. Los organismos fueron mantenidos en un tanque de fibra de vidrio de 460 l con aireación, flujo de agua continuo, a una temperatura de 16°C y alimentados con la macroalga *Macrosystis pyrifera*. Después de siete días, tres machos y cuatro hembras fueron inducidos al desove por el método de peróxido de hidrógeno (Morse, 1977), en acuarios separados con un volumen de 10 litros cada uno. Se expusieron a una concentración de 5mM de peróxido de hidrógeno, por tres horas, antes de cambiarles el agua, para que iniciaran el desove.

4.4 Fertilización

Los espermatozoides fueron lavados en un tamíz con agua de mar filtrada a 1 μm y pasada por UV, y cuantificados en un microscopio compuesto. Los óvulos se recuperaron con un tamíz de 108 μm , y se enjuagaron suavemente con agua filtrada y pasada por luz UV. La fertilización se llevó a cabo en un recipiente de 18 litros, que contenía en el fondo una capa homogénea de óvulos y una concentración final de 300,000 espermatozoides/ml. Después de 10 minutos de haber homogenizado el contenido, los óvulos fueron lavados en tres ocasiones con espacio de 10 minutos, para quitar el exceso de espermatozoides. Las larvas trocóforas fueron obtenidas 24 horas después de la fertilización al ocurrir la eclosión. Estas fueron removidas del recipiente con un sifón, dejando en el fondo, óvulos sin fertilizar, larvas anormales y otros desechos producto de la fertilización. Se transfirieron a otros recipientes para continuar el cultivo.

4.5 Cultivo de larvas

Las larvas fueron cultivadas en cubetas de 18 litros a una densidad de 7 larvas/ml con la técnica japonesa, que consistió en un sistema cerrado (sin flujo), con cambios diarios de agua filtrada a $1\mu\text{m}$ y pasada por luz ultravioleta (Grant, 1981). Los cambios de agua se hicieron por decantación, filtrando el agua a través de un tamiz de $108\mu\text{m}$ para retener las larvas y en cada ocasión se tomó una muestra para observar al microscopio su condición y estadio de desarrollo.

Al tercer día, como medida preventiva, a las larvas en estadio véliger, se les aplicaron los antibióticos de penicilina procaínica y estreptomicina por 24 horas, ambos a una concentración de 75 mg/l. El cultivo de larvas se mantuvo por siete días, a una temperatura promedio de $16^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, hasta que las larvas fueron consideradas competentes para ser inducidas al asentamiento y metamorfosis.

Experimento:

Cada día se prepararon nueve cubetas de 18 litros, que correspondieron a los tres tratamientos (dos inductores y el testigo sin inductor) con sus tres réplicas (Figura 1). En cada cubeta se introdujeron 2500 larvas, a una densidad para el asentamiento de 1 larva/cm². Se utilizaron un total de 130,000 larvas.

Las diatomeas bentónicas utilizadas como inductores y alimento, fueron del género *Nitzschia* sp, de la cual se realizaron cultivos semicontinuos controlados en el Laboratorio de Microalgas del mismo Instituto.

Las cubetas con diatomeas bentónicas se prepararon 24 horas antes de la inducción. Se usaron cubetas limpias que fueron inoculadas con las diatomeas a una concentración de 12,000 cel/cm² y permanecieron sin aireación y flujo por 24 horas, hasta que se formó una delgada película de diatomeas en toda el área sumergida del recipiente. Las cubetas testigo y las utilizadas para aplicar el GABA se mantuvieron limpias en el momento de la

inducción y 24 horas después se inocularon las diatomeas que sirvieron como alimento. El sexto y último día de inducción al asentamiento y metamorfosis de las larvas, quedaron un total de 54 recipientes experimentales. Estos fueron distribuidos al azar dentro de cuatro charolas de fibra de vidrio de 2.0 x 1.0 x 0.20 m, en las cuales se colectó el agua proveniente de cada recipiente.

Cada cubeta se mantuvo con un flujo permanente de 300 ml/min de agua de mar filtrada a 1 μ m. Se proporcionó iluminación constante con lámparas fluorescentes de luz de día, de tamaño de 8 pies y tubos luminicentes de 40 watts, para permitir el crecimiento poblacional de diatomeas bentónicas y evitar el calentamiento. Se colocó una piedra de aireación en cada recipiente y para mantener el oxígeno disuelto aproximadamente a 7.5 mg/l.

4.6 Metamorfosis

Se consideraron en proceso de metamorfosis aquellas larvas que perdieron el vélum o que presentaron la concha peristomal, como se muestra en la figura 2 (Seki y Kan-no, 1981). La concha peristomal, es la concha nueva que es segregada por el manto, que se forma en el proceso de metamorfosis y que se diferencia de la concha larval por ser más rugosa, gruesa y menos transparente. La evaluación de la metamorfosis se llevó a cabo 24 horas después de la inducción. Se tomaron de cada cubeta dos muestras al azar, como se describe a continuación. Se procedió a decantar el agua de cada recipiente a través de un tamíz de 108 μ m para retener las larvas, las cuales fueron nuevamente regresadas a la cubeta en un volumen de un litro. Entonces, se introdujo un cilindro de plástico con un área de boca de 14 cm², que se mantuvo firmemente contra el fondo y en la parte interna se hizo un barrido con un pincel de pelo fino. De inmediato, se extrajo el volumen de agua con una pipeta de 25 ml y se colectaron tanto las larvas que se encontraban en suspensión, como las poslarvas que ocupaban el sustrato al interior del cilindro. La muestra se

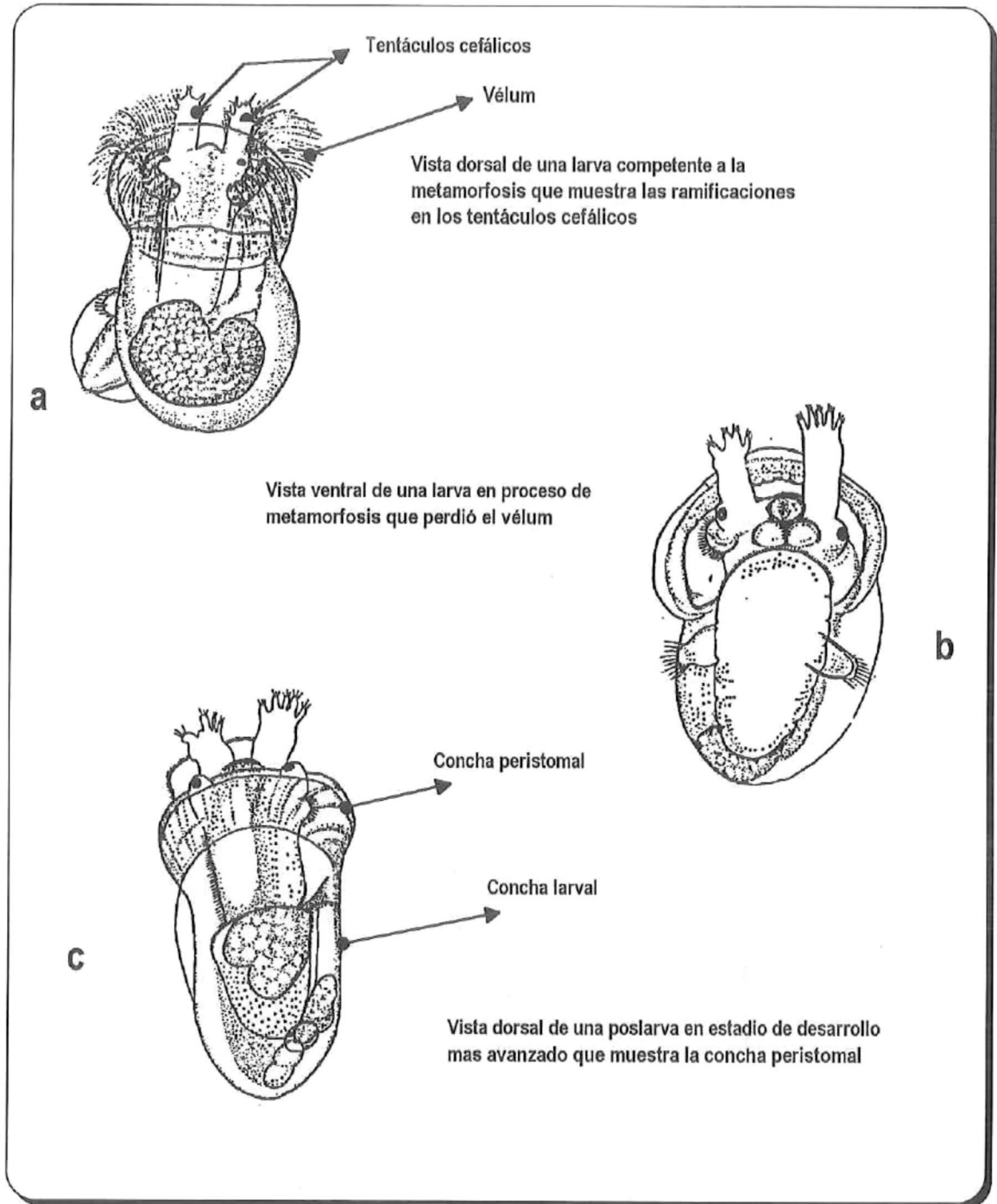


Figura 2.- a) Estadio larval de competencia al asentamiento y metamorfosis y b, c) criterios de evaluación de la metamorfosis.

transfirió a un tamiz y luego a una camarilla de conteo para ser analizada en su totalidad en un microscopio compuesto. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones en cada recipiente, por lo que el área muestreada fue de 28 cm² (5.4%), de un total de 515 cm², que corresponden a el área del fondo de la cubeta, donde se encontraban la totalidad de los organismos (larva y poslarva). Se consideraron tres categorías; larva, poslarva sin vélum y poslarva con concha peristomal. Al final se estimó el porcentaje de metamorfosis sumando tanto las poslarvas sin vélum, como las que presentaron concha peristomal.

Para evaluar el efecto inicial del inductor en el desarrollo de las poslarvas, se estableció la relación de aquellas que presentaron concha peristomal a las 24 horas de la inducción con los porcentajes de metamorfosis.

4.7 Desarrollo de la Rádula

Durante el experimento, se tomaron muestras diariamente, para evaluar el estado de desarrollo de la rádula. Se aplicó la técnica utilizada en Nueva Zelandia y descrita por Tong y Moss (1992). Finalmente, se contó el número de hileras de dientes en la rádula de 20 larvas cada día y se estimó el promedio, en cada ocasión.

4.8 Crecimiento

La longitud de los organismos se evaluó a los 9, 29, 45 y 63 días de edad. De cada cubeta se extrajeron 12 organismos al azar, por triplicado, por lo cual correspondieron a un total de 36 por tratamiento. Los animales fueron medidos con una reglilla micrométrica en el microscopio compuesto y, con el microscopio estereoscópico cuando su tamaño promedio rebasó las 1500 μm . El crecimiento se comparó entre las poslarvas asentadas con los dos inductores experimentales y entre las larvas que se metamorfizaron a diferentes edades con un mismo inductor.

4.9 Supervivencia

Se evaluó la supervivencia en todas las cubetas a los 29, 45 y 63 días, para lo cual se efectuaron conteos directos de todas las poslarvas y/o juveniles presentes. Para calcular, el porcentaje de supervivencia se consideró como 100% a las 2500 larvas iniciales inducidas a la metamorfosis en cada recipiente.

4.10 Análisis Estadístico

a) Evaluación de los efectos de la edad de las larvas en la metamorfosis:

El modelo experimental de dos factores fijos, correspondientes a la edad de la larva y los inductores, se analizó a través de un análisis de varianza (ANDEVA), de dos vías, al cumplir las condiciones de normalidad, Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de varianzas, con la prueba de Bartlett (Zar, 1984), que se realizaron en un programa estadístico, STATGRAPH versión 6.0.

Los juegos de hipótesis estadísticas a probar fueron las siguientes:

H_0 = No hay diferencias en la metamorfosis obtenida con larvas que son inducidas a diferentes edades (días).

H_A = Si hay diferencias en la metamorfosis obtenida con larvas que son inducidas a diferentes edades (días).

H_0 = No hay diferencia en la metamorfosis obtenida entre los inductores, GABA y diatomeas bentónicas.

H_A = Si hay diferencia en la metamorfosis obtenida entre los inductores, GABA y diatomeas bentónicas.

H_0 = No hay un efecto de interacción de la edad de las larvas y los inductores, en la metamorfosis obtenida.

H_A = Si hay un efecto de interacción de la edad de las larvas y los inductores, en la metamorfosis obtenida.

Con la finalidad de obtener más información, posteriormente se procedió con el ANDEVA (Análisis de Varianza) de una vía, para comparar la metamorfosis obtenida con cada inductor a diferentes edades de la larva. Cuando se encontraron diferencias ($\alpha < 0.05$) se realizaron contrastes múltiples con la prueba de Scheffe (Zar, 1984). Esta prueba puede ser usada para probar hipótesis nulas de la forma $H_0 : \mu_B - \mu_A = 0$ y no requiere muestras de igual tamaño. Los análisis se refieren a las pruebas de "contrastos múltiples", cuando se tienen que realizar varias comparaciones simultáneamente.

Se aplicaron los modelos multiplicativo y lineal a los datos de metamorfosis obtenidos con los dos inductores.

Se realizó un análisis de correlación para evaluar la intensidad de asociación de las variables; edad (días) de la larva, y número de hileras de dientes en la rádula.

c) Crecimiento

Debido a la tendencia lineal del crecimiento mostrado por los organismos durante este estudio (Figuras 9 y 10), para obtener un mejor ajuste lineal de los datos se aplicó una regresión de mínimos cuadrados. El criterio de mínimos cuadrados, considera la desviación vertical de cada punto de la línea, y define el mejor ajuste lineal, como aquel que resulta con el valor más pequeño de la suma de cuadrados de esas desviaciones, para todos los valores de Y_i y Y_i . Posteriormente, fueron comparadas las pendientes (con la prueba de Tukey, en Zar, 1984), obtenidas de los datos de crecimiento de organismos provenientes de larvas de diferentes edades con un mismo inductor. Para cada evaluación del crecimiento, 9, 45 y 63 días, se compararon entre los tratamientos para cada inductor, por medio de un ANDEVA, ya que los datos fueron normales, y se determinó la

homogeneidad de varianzas. También se compararon los crecimientos promedio para una misma edad de la larva, pero provenientes de diferente inductor (t Student).

d) Supervivencia

Los porcentajes de supervivencia cumplieron las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que fueron tratados con un ANDEVA de una vía para comparar los datos obtenidos de las diferentes edades de larvas con un mismo inductor y por otro lado, comparar éstas entre inductores. Se llevó a cabo un análisis de correlación simple para determinar si hay asociación entre la supervivencia y la edad de la larva al momento de ser inducida a la metamorfosis, considerando como hipótesis, que las larvas inducidas a una mayor edad, resulten con mayores porcentajes de supervivencia. De igual manera se buscó la relación entre la supervivencia y el porcentaje de metamorfosis, considerando como hipótesis que, en los tratamientos que se obtuvieron mayores tasas de metamorfosis, resultaron también con los porcentajes de supervivencia más grandes.

5. RESULTADOS

5.1 Metamorfosis

La metamorfosis fue afectada ($p < 0.01$) por la edad de la larva en el momento de la inducción, y la mejor edad para inducir a las larvas fue diferente ($p < 0.01$) para cada inductor (Figura 3; Tabla I, ver anexo). Además, hubo interacción ($p < 0.01$) entre los inductores y la edad de las larvas en la metamorfosis promedio.

La metamorfosis promedio obtenida con GABA y diatomeas bentónicas, presentaron cada una, diferencias con la edad de la larva ($p < 0.05$; Tablas II y III, ver anexo) y tendencias distintas (Figura 3). El GABA proporcionó los porcentajes de metamorfosis más altos y fueron superiores en los seis días de inducción, a los obtenidos con diatomeas bentónicas. Presentaron una tendencia ascendente, que inicia a la edad de 7 días con 43% y finaliza a la edad de 12 días con 96%. Con GABA, los valores se ajustaron a el modelo multiplicativo y el modelo lineal (Tabla IV, ver anexo). Se encontraron diferencias ($p < 0.01$), en la metamorfosis obtenida a distintas edades, con la presencia de dos grupos que determinó la prueba de comparaciones múltiples de Scheffe (Tabla II, ver anexo); el primero para la edad de 7-8 días y el segundo de 8 a 12.

Con las diatomeas bentónicas los valores de metamorfosis fluctuaron del 11.3% al 37.5% (Figura 3, Tabla II, ver anexo). Estos no siguieron un patrón bien definido, como sucedió con GABA, ya que el valor máximo ocurrió a la edad de 8 días y luego disminuyó para incrementarse de nuevo a la edad de 11 días y disminuir nuevamente el siguiente día. La metamorfosis mostró diferencias ($p < 0.05$) y la prueba de comparaciones múltiples separó dos grupos que están traslapados, pero que algunos valores formaron parte de ambos (Tabla III, ver anexo). Los datos no se ajustaron al Modelo Lineal.

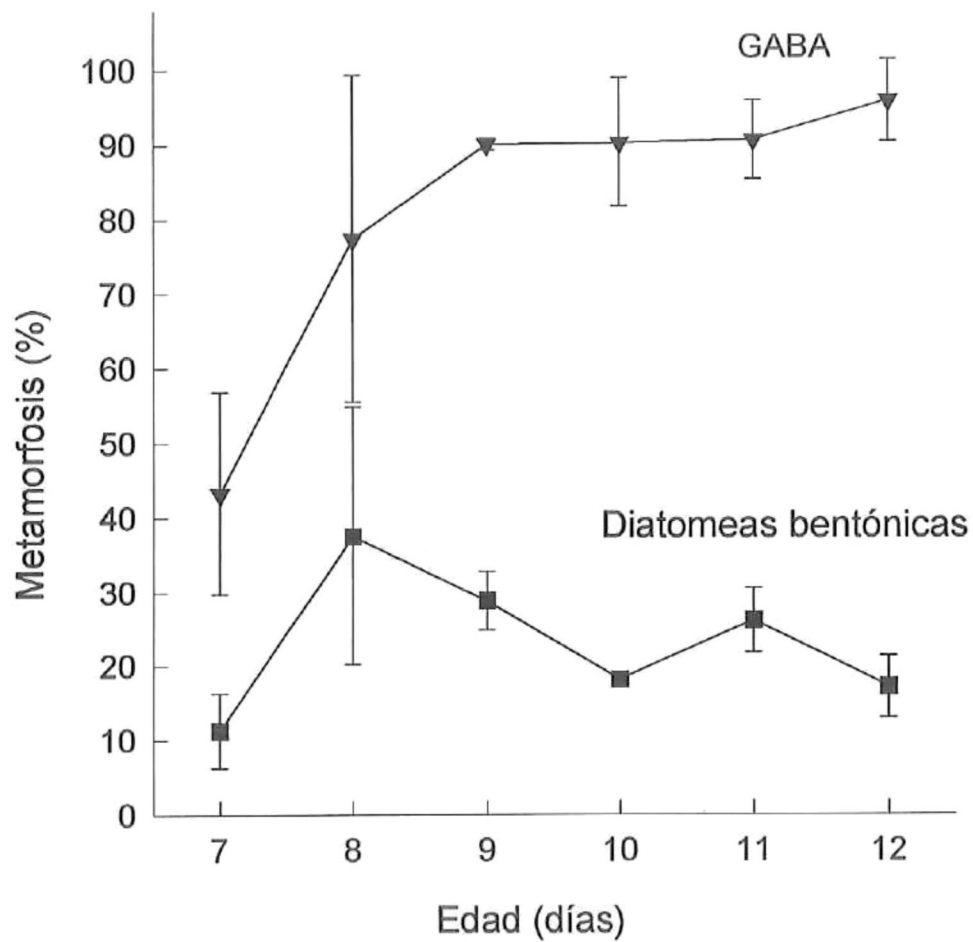


Figura 3.- Porcentaje de metamorfosis en larvas competentes de diferentes edades (7-12 días), de *Haliotis rufescens* inducidas con GABA y diatomeas bentónicas. Las líneas verticales representan la desviación estandar.

El porcentaje de conchas peristomales evaluado 24 horas después de la inducción, mostró diferente comportamiento para cada inductor. Cuando se usó GABA, los porcentajes fueron altos y con un incremento constante de los 7 días de edad con 4.4%, hasta los 12 días con 77%, avanzando casi en forma paralela a la metamorfosis (Figura 4). Los porcentajes fueron diferentes ($p < 0.01$), y se separaron en dos grupos con la prueba de Scheffe (Tabla V, ver anexo). Con las diatomeas bentónicas los porcentajes de conchas peristomales fueron muy bajos, presentaron diferencias con la edad de la larva (Tabla VI, ver anexo) y alcanzaron un valor máximo de 6.4% a la edad de 4 días (Figura 5). La prueba de comparaciones múltiples separó dos grupos (Tabla VI, ver anexo).

5.2 Desarrollo de la rádula

El número de hileras de dientes en la rádula mostró un incremento lineal en función de la edad de la larva, con un coeficiente de determinación (R^2) de 88%. La relación promedio de número de hileras de dientes y los porcentajes de metamorfosis obtenidos con los dos inductores, se muestra en la figura 6. A la edad de 7 días, cuando la larva inició su estadio de competencia a la metamorfosis, presentó un promedio de 7 hileras de dientes y de 10 cuando la metamorfosis llegó al 90%. Para el valor de metamorfosis más alto de 96% el número promedio fue de 13 (Figuras 7 y 8).

5.3 Crecimiento

El crecimiento de las poslarvas y juveniles obtenidos de la inducción de las larvas con GABA y diatomeas bentónicas mostró una asociación lineal en ambos casos (Figuras 9 y 10; Tablas VII y IX, ver anexo). A los 9 días las poslarvas obtenidas con diatomeas bentónicas presentaron un mayor crecimiento y una mayor variabilidad que las obtenidas con el GABA. A los 63 días las longitudes promedio para las obtenidas con GABA fueron de 1827 μm , con una desviación estándar de 521 μm , a 2030 μm , con una desviación estándar de 594 μm y para diatomeas de 1419 μm , con una desviación estándar de 231 μm ,

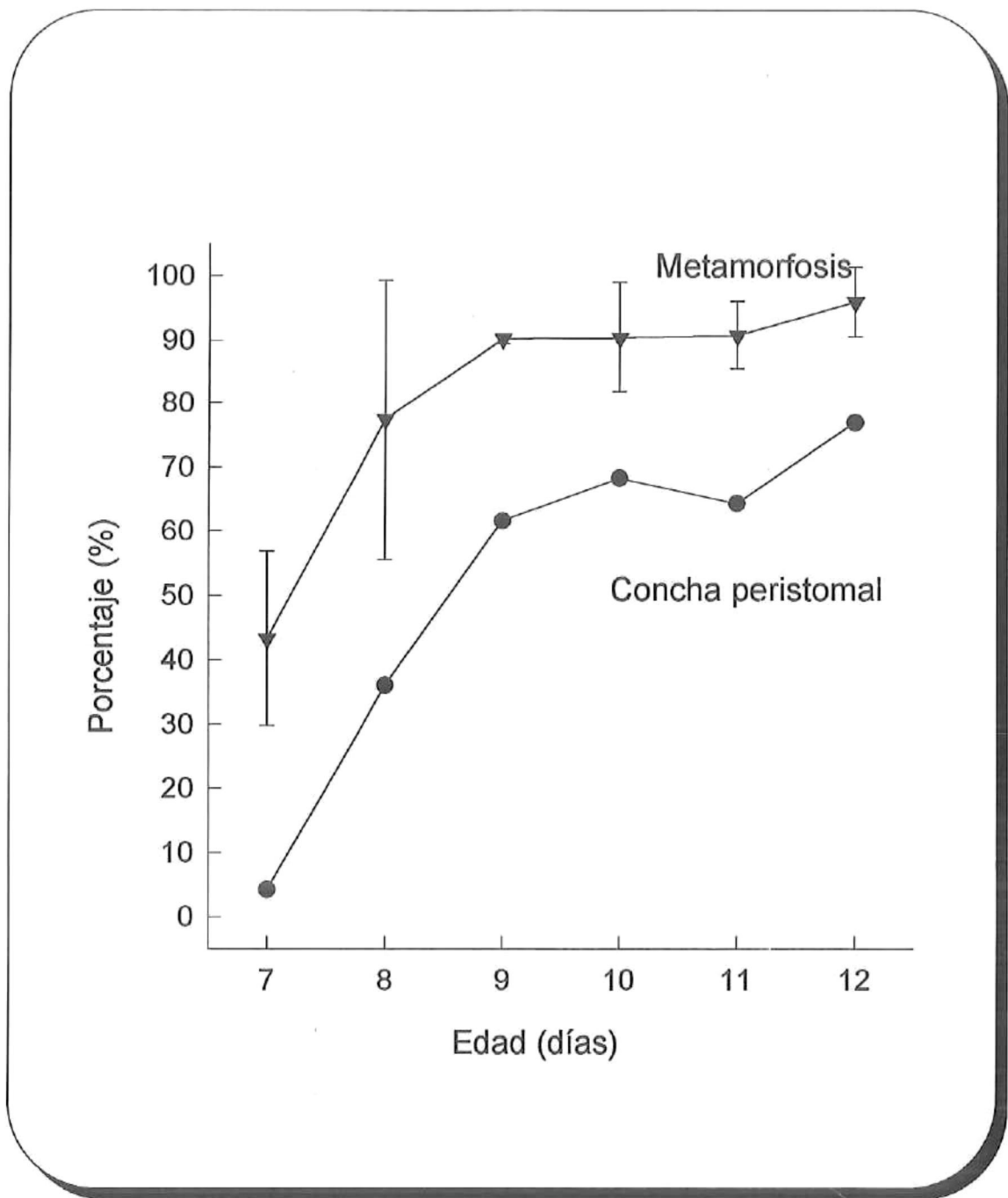


Figura 4.- Porcentaje de metamorfosis en larvas competentes de *Haliotis rufescens*, inducidas con GABA, a diferentes edades y de poslarvas con conchas peristomales presentes 24 horas después de la inducción. Las líneas verticales corresponden a la desviación estandar

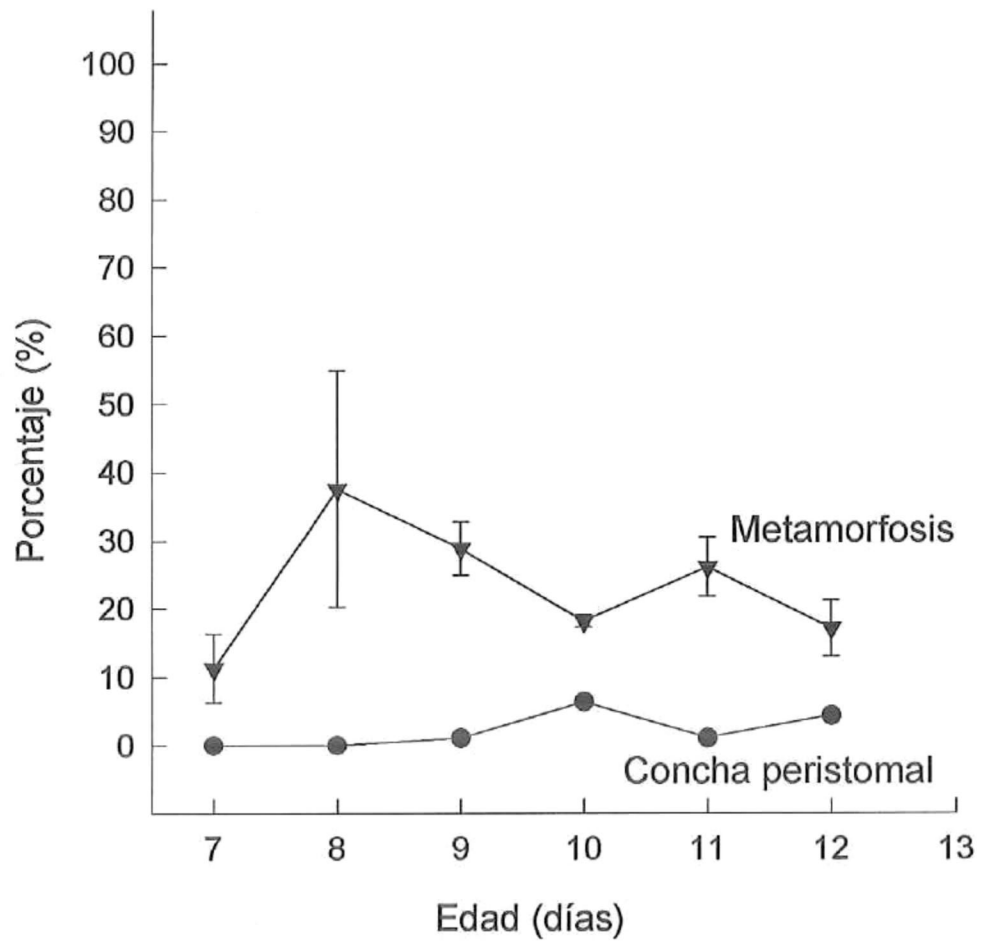


Figura 5.- Porcentaje de metamorfosis en larvas de *Haliotis rufescens* de diferentes edades, inducidas con diatomeas bentónicas y de poslarvas con conchas peristomales presentes 24 horas después de la inducción. Las líneas verticales corresponden a la desviación estandar.

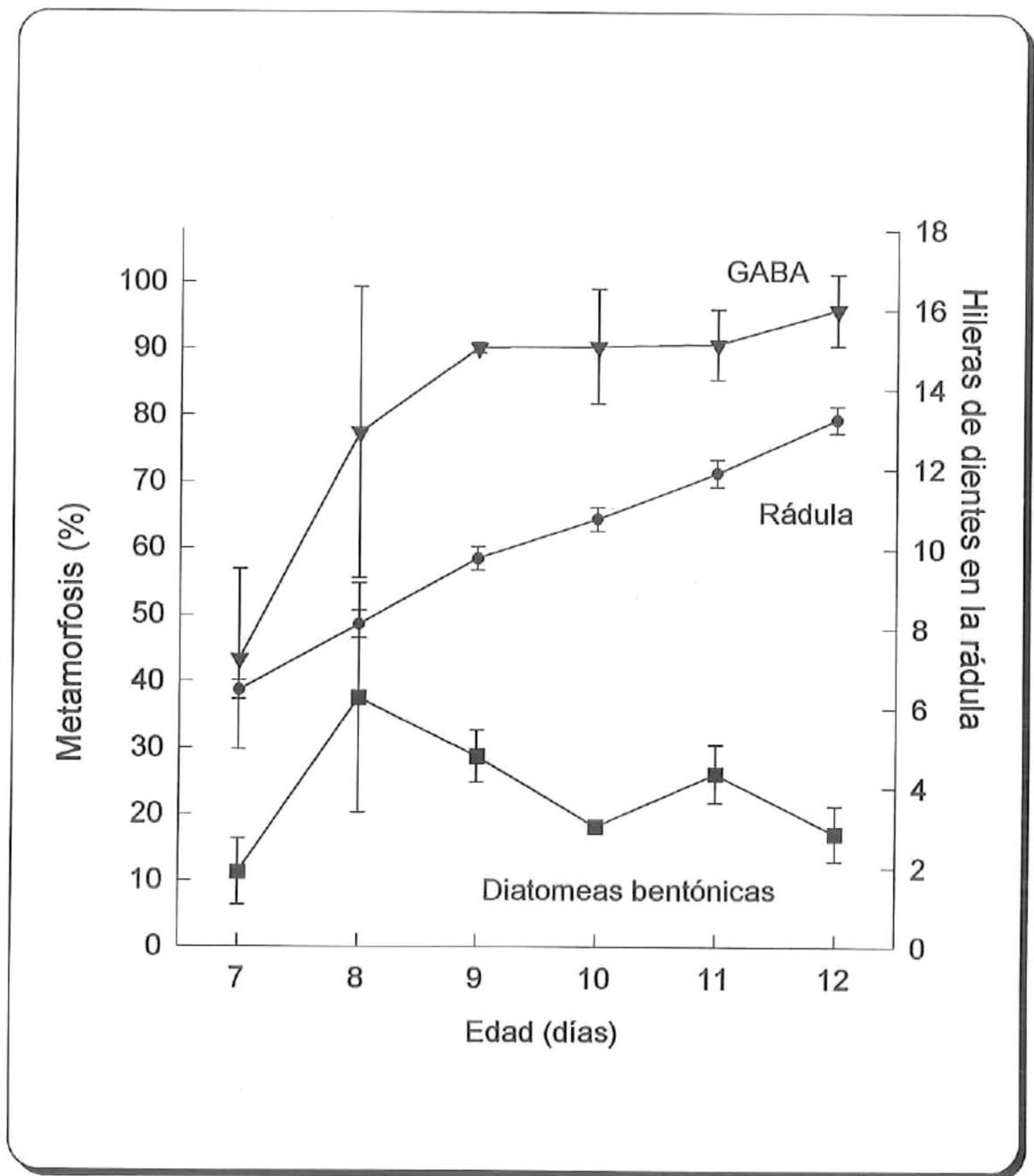


Figura 6.- Incremento en el número promedio de hileras de dientes en la rádula, de larvas de diferentes edades de *Haliotis rufescens* y su relación con los porcentajes de metamorfosis obtenidos con los inductores; GABA y diatomeas bentónicas. A la edad de 7 días, las larvas presentaron cuatro ramificaciones en los tentáculos cefálicos. Las líneas verticales corresponden a la desviación estandar.

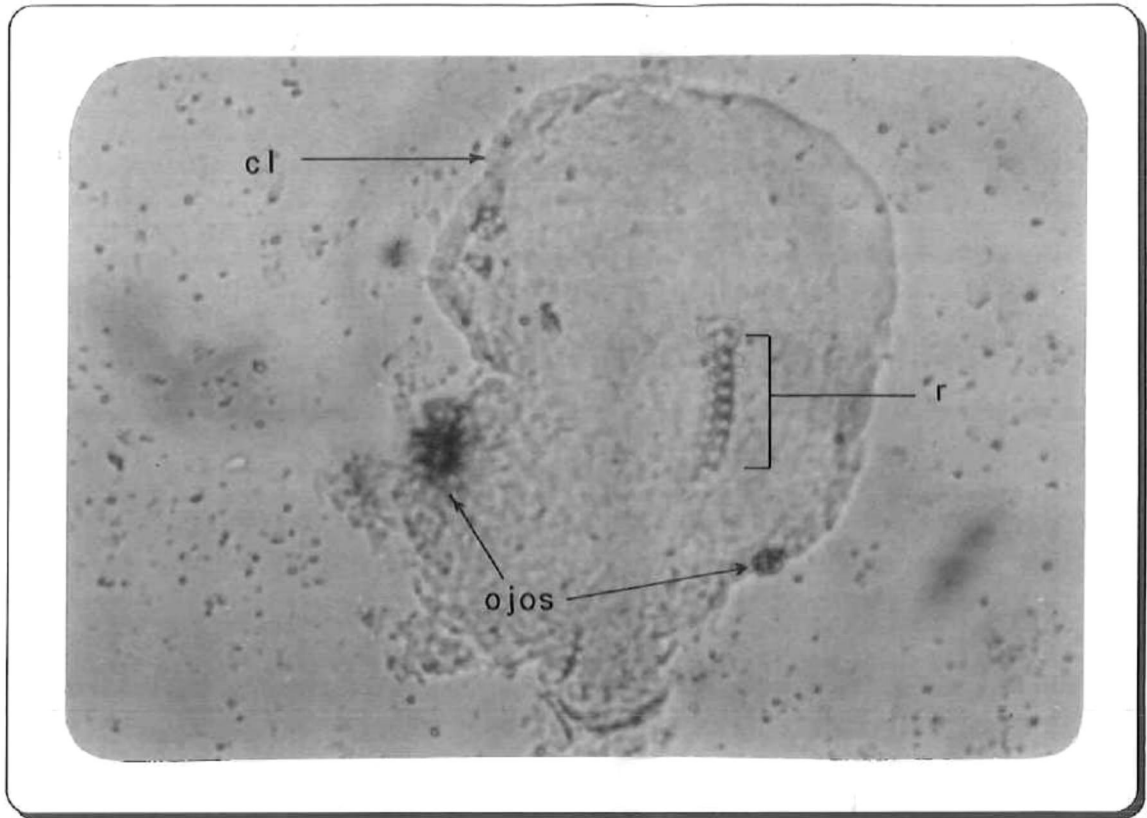


Figura 7.- Larva de abulón *H. rufescens* vista al microscopio compuesto que muestra la rádula después de aplicar la técnica descrita por Tong y Moss (1992).

a 2106 μm , con un desviación estandar de 489 μm (Tablas, XI y XII, ver anexo). Cuando los datos de crecimiento obtenidos a los 9, 45 y 63 días fueron tratados con un análisis de regresión, para ajustar a una recta y las pendientes se compararon con la prueba de Tukey, en el caso de las diatomeas bentónicas, se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre todas las pendientes (Tabla X, ver anexo). Con GABA, el resultado fue prácticamente el mismo con la excepción de las inducidas a los 10 y 11 días de edad (Tabla VIII, ver anexo).

Las poslarvas obtenidas con GABA y diatomeas, a los nueve días, presentaron diferencias ($p < 0.05$) en el crecimiento (Tablas XIII y XIV, ver anexo). A los 45 días las

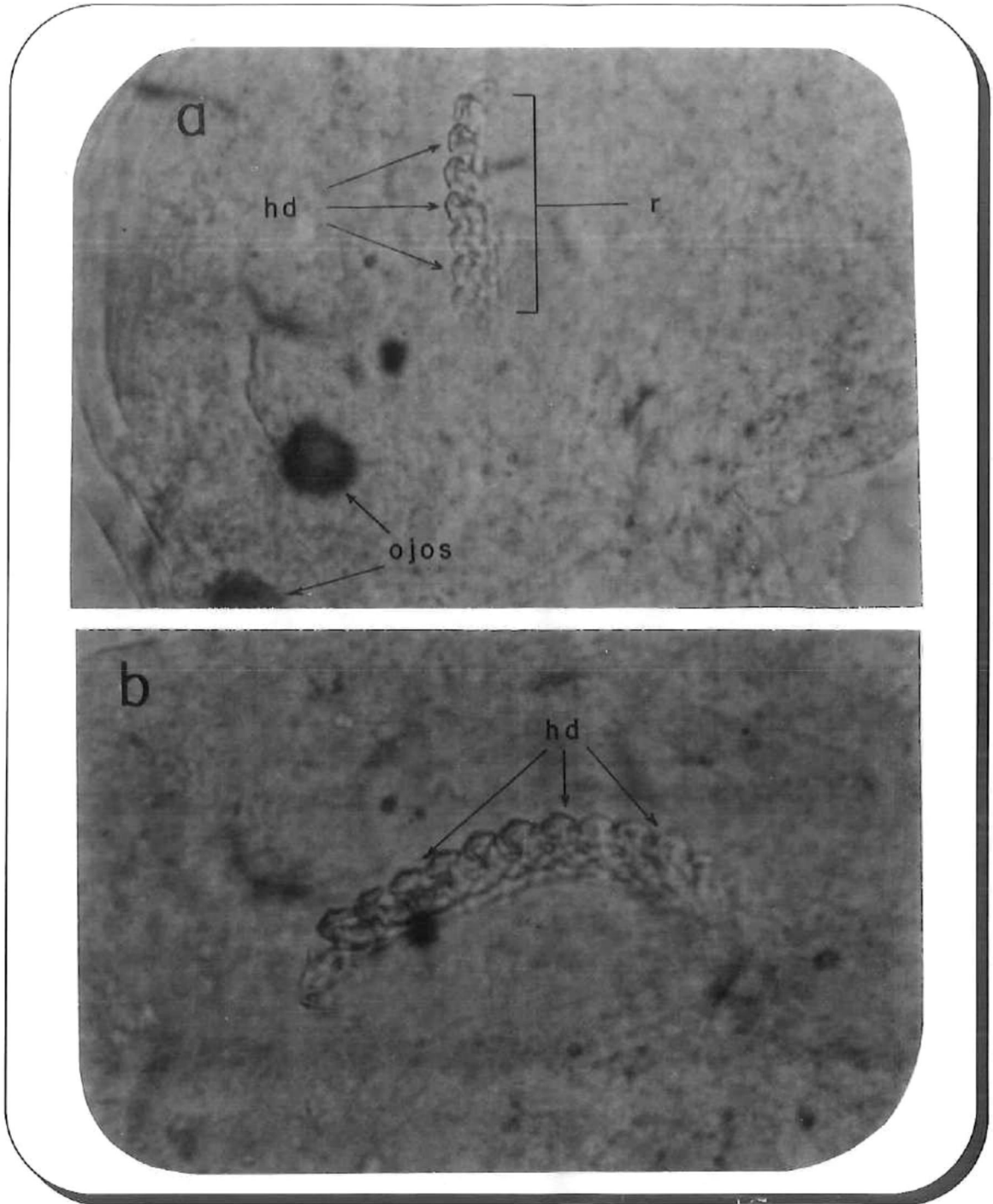


Figura 8.- Rátulas de larvas de abulón *H. rufescens*. a) Rátula con 7 hileras de dientes. b) Rátula con 11 hileras de dientes (r = rátula; hd = hileras de dientes).

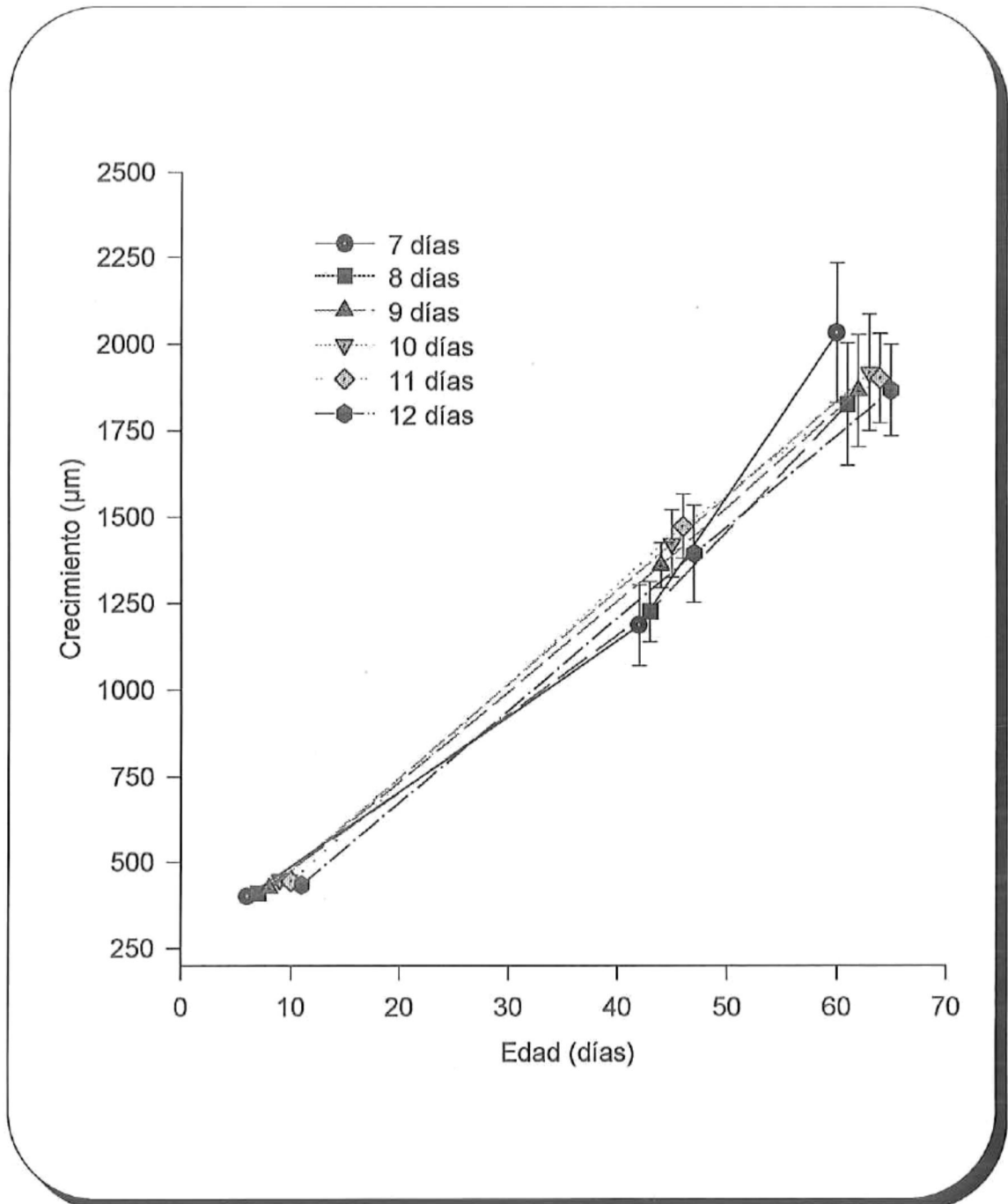


Figura 9.- Crecimiento de poslarvas-juveniles de *Haliotis rufescens*, obtenidas de larvas que fueron inducidas a la metamorfosis a diferentes edades (7-12 días), con GABA. Las líneas verticales corresponden a la desviación estandar.

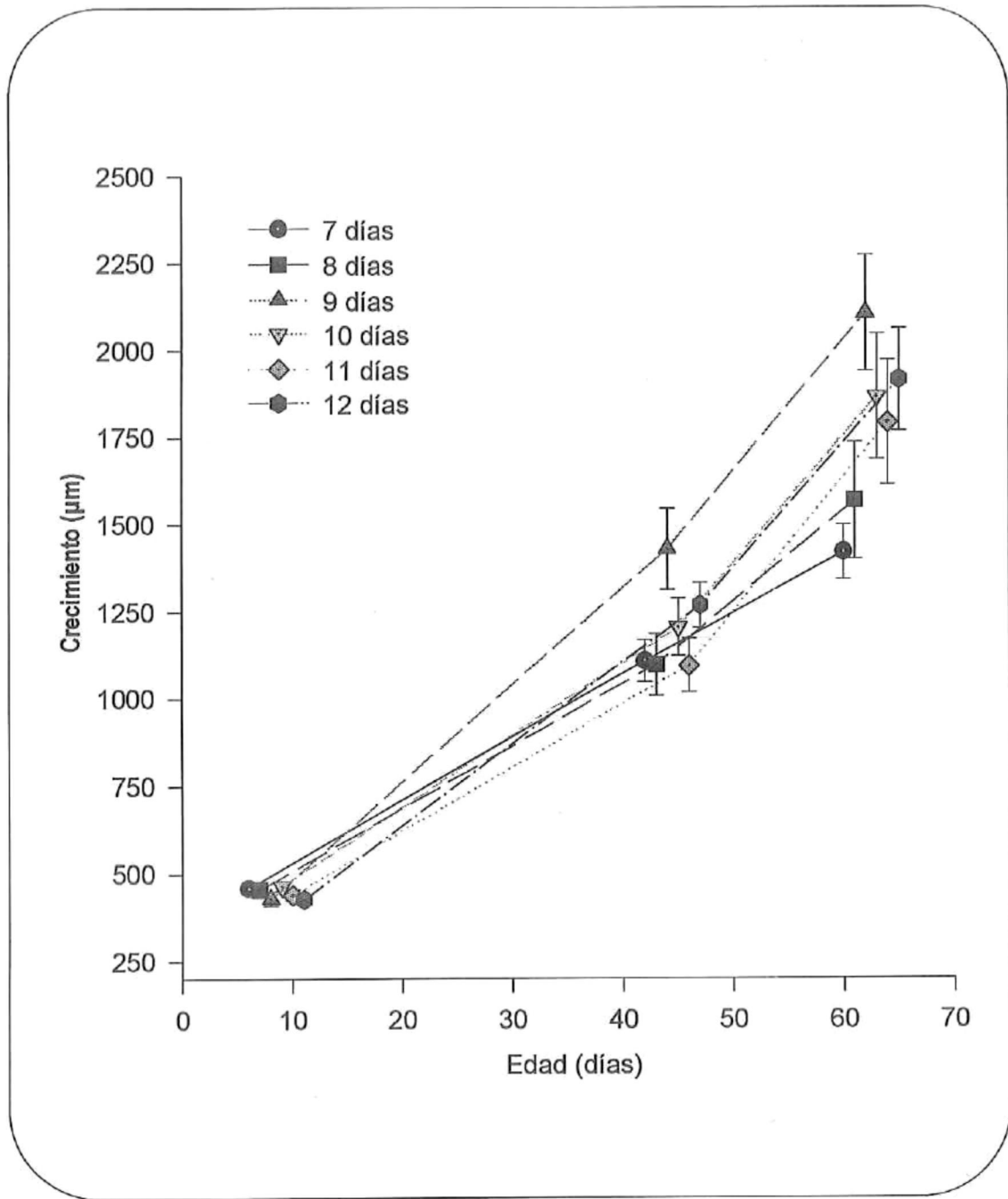


Figura 10.- Crecimiento de poslarvas-juveniles de *Haliotis rufescens*, obtenidas de larvas que fueron inducidas a la metamorfosis a diferentes edades (7-12 días), con diatomeas bentónicas. Las líneas verticales corresponden a la desviación estandar.

diferencias prevalecieron, y se mantuvieron a los 63 días, en las obtenidas con diatomeas, pero no en las obtenidas con GABA. Las comparaciones del crecimiento promedio entre juveniles provenientes de una misma edad de la larva pero de diferente inductor con la prueba t Student, no mostró un patrón definido, ya que a los 9 días las diferencias ($p < 0.05$), fueron para los que provenían de larva de 7 y 8 días de edad (Tabla XV, ver anexo). Finalmente a los 63 días, las diferencias fueron únicamente para los provenientes de larvas de edades de 7 y 9 días.

5.4 Sobrevivencia

Durante el primer mes ocurrió la reducción más importante de poslarva y disminuyó gradualmente los dos meses posteriores. Los porcentajes de mortalidad durante los primeros 29 días, después de la metamorfosis con ambos inductores, fueron del 79% al 97%, (Figuras 11 y 12, Tablas XVI y XVII, ver anexo). La mortalidad no fue la misma para los diferentes tratamientos, y se observó una tendencia de una mayor mortalidad para las poslarvas provenientes de larvas de mayor edad, de 11 y 12 días con GABA y de 10 y 12 días con diatomeas. La cantidad de poslarvas a los 29 días, varió entre 69 y 393 poslarvas por cubeta con GABA, y de 208 a 516 con diatomeas. Sin embargo, a los 45 días los resultados fueron similares, con porcentajes por debajo del 15% y a los 63 días en todos los casos menos del 7% (Tablas XVI y XVII, ver anexo).

En los porcentajes de sobrevivencia, se realizó un ANDEVA para comparar la sobrevivencia para cada tratamiento con cada inductor. A los 29 días, en el caso de las diatomeas bentónicas no se encontraron diferencias ($p > 0.05$, Tabla XIX, ver anexo), y sí ocurrieron con el GABA, separándose en este último caso únicamente dos grupos en la prueba de Scheffe (Tabla XVIII, ver anexo). La prueba de ANDEVA para los 45 y 63 días para el GABA y diatomeas bentónicas respectivamente, muestra que únicamente hubo diferencias ($p > 0.05$) a los 45 días con el GABA (Tablas XX y XXI, ver anexo).

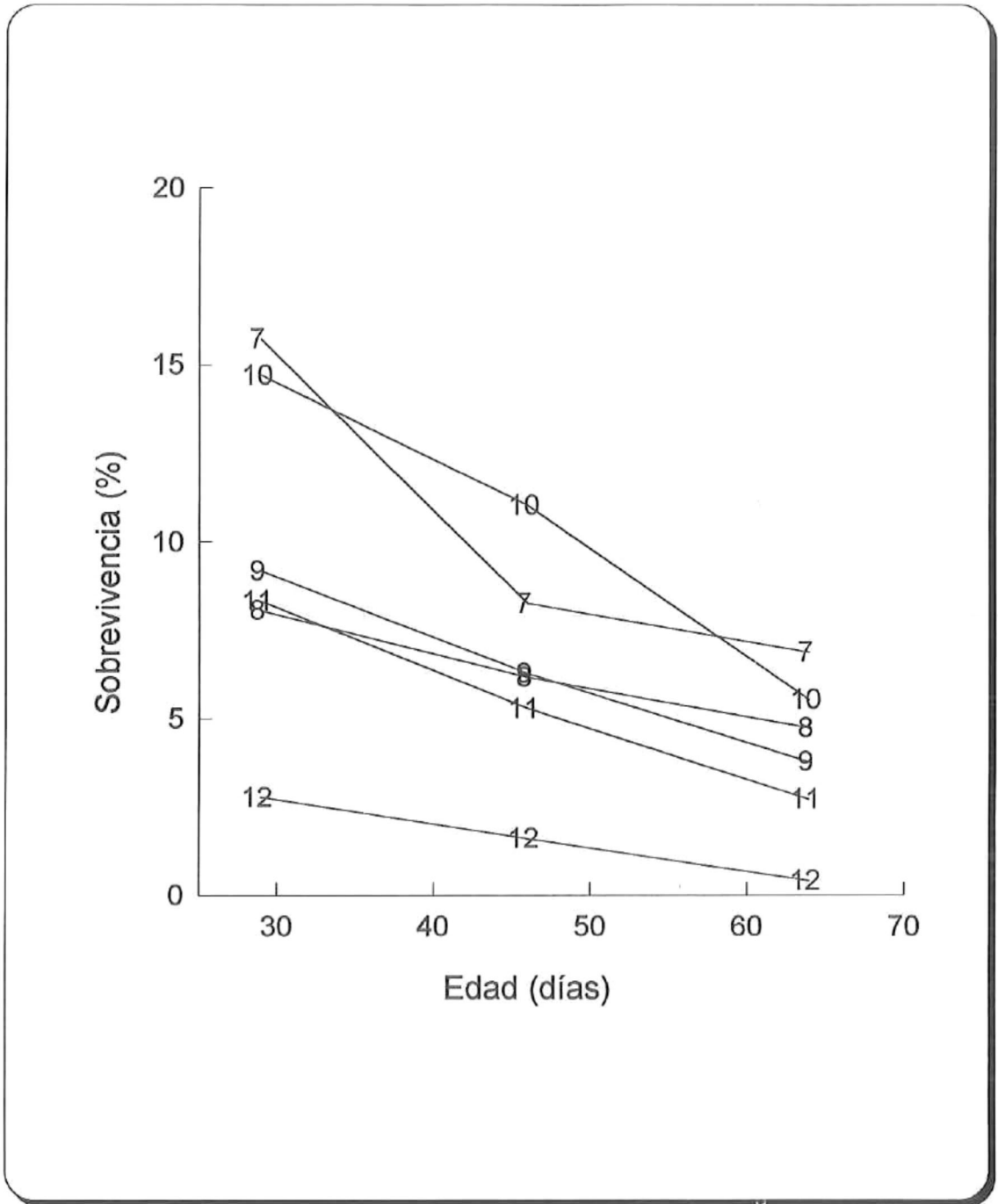


Figura 11.- Sobrevivencia de poslarvas-juveniles de *Haliotis rufescens*, obtenidos de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con GABA.

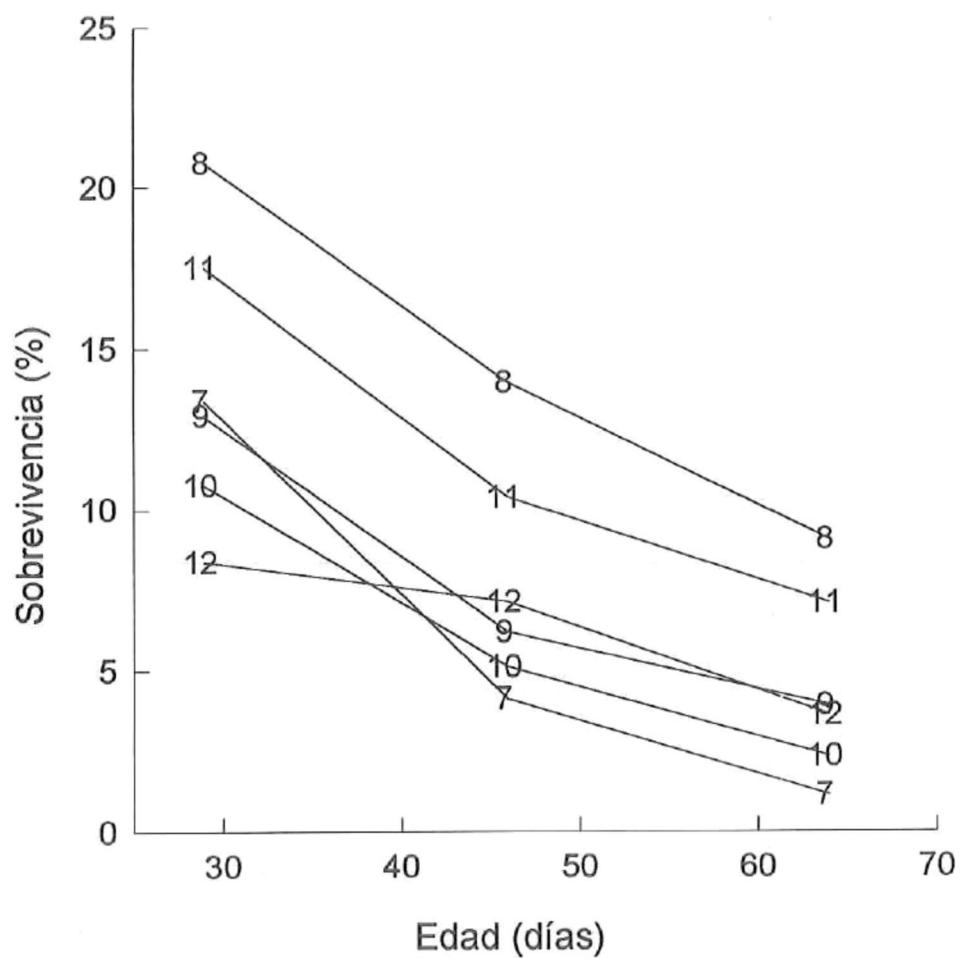


Figura 12.- Sobrevivencia de poslarvas-juveniles de *Haliotis rufescens*, obtenidos de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con diatomeas bentónicas.

El coeficiente de determinación entre la sobrevivencia y la edad de la larva, cuando se usaron diatomeas bentónicas como inductor fue de $R^2 = 8.6$. Con GABA, fue mayor, de $R^2 = 33.8$. En el nivel de asociación entre la sobrevivencia y la metamorfosis, cuando se usó GABA, nuevamente fue mayor, con una $R^2 = 40.3$. En el caso de las diatomeas bentónicas, el coeficiente de determinación (R^2) fue 8.6.

6. DISCUSION

6.1 Metamorfosis

El efecto de la edad de la larva en la metamorfosis, fue más notable cuando se realizó la inducción con GABA que con diatomeas bentónicas. Con ambos inductores se obtuvieron diferencias en los valores de metamorfosis con la edad de la larva, pero se observó una tendencia más clara con GABA. Además, la mayor respuesta a la inducción a la metamorfosis ocurrió a diferentes edades de larva para cada inductor (Figura 6). Con diatomeas bentónicas, el máximo de metamorfosis ocurrió a la edad de 8 días. Con GABA aún cuando a los 12 días se obtuvo el 96%, desde la edad de 9 días, el porcentaje de metamorfosis obtuvo un valor cercano al 100%. Por lo tanto se puede considerar que a los 9 días, en este caso es el tiempo más adecuado para inducir las larvas a la metamorfosis, con GABA. Con ambos inductores la diferencia más importante ocurrió entre los primeros 2-3 días. El no haber encontrado diferencias entre los valores de metamorfosis al utilizar diatomeas, los días posteriores, puede deberse a la variabilidad en los resultados, principalmente del día 8 (Tabla III). También por el bajo número de réplicas, pues el valor de la media del día 8, es más del doble, de los obtenidos los días 10 y 12, sin que se encontrara una diferencia estadística.

Los diferentes valores de metamorfosis con la edad de la larva ocurrieron los primeros días de competencia con ambos inductores (Figuras 1 y 2). Por lo tanto, con las características consideradas como indicadores de la competencia a la metamorfosis, como; las ramificaciones de los tentáculos cefálicos y un comportamiento de búsqueda de sustrato, no se puede determinar cual es el mejor momento para que sean inducidas a la metamorfosis. Lo anterior se fundamenta en que el tiempo de búsqueda se puede prolongar varios días y su respuesta a los inductores aplicados que pueden activar el proceso, también cambió durante ese tiempo. Barlow (1990), determinó para *H. rufescens*, que a los 7 días, la larva estaba competente para el asentamiento y obtuvo tasas

de asentamiento mayores del 60%. Sin embargo, la metamorfosis ocurrió hasta el día 10 en un 30% (72 horas después de que se determinó que las larvas eran competentes para el asentamiento). Fue a partir de este día cuando se inició una mejor sincronización entre asentamiento y metamorfosis. Esto se debió a que desde el día 10, las larvas fueron competentes a la metamorfosis. Sin embargo, el autor no hizo observaciones de las ramificaciones en los tentáculos cefálicos. En mi investigación, debido a el número de larvas con que se trabajó, no fue posible hacer una diferenciación entre el asentamiento y la metamorfosis, por lo que se evaluó únicamente esta última. Considerando lo anterior, los resultados fueron similares, ya que a partir de que las larvas se consideraron competentes, en ese mismo día (edad 7), se obtuvieron resultados en la metamorfosis, con porcentajes promedio similares (40%). Para el día 9, alcanzó el 90% y se mantuvo por arriba de este valor los días siguientes, con un comportamiento muy similar al señalado por Barlow (1990). La diferencia en la edad de competencia de la larva a la metamorfosis entre los dos estudios, puede deberse principalmente a las diferentes temperaturas a la que se cultivaron las larvas, ya que en el experimento señalado, la temperatura fue de 15° C, mientras que en este estudio, entre los 15° y 17° C. Es de esperarse una diferencia en el desarrollo de las larvas cultivadas a mayor temperatura, de manera que su estadio de competencia a la metamorfosis lo alcanzaron dos días antes. Es importante destacar este hecho, ya que no se puede determinar una edad fija óptima de la respuesta de la larva para que sea inducida a la metamorfosis, pues este estado variará de acuerdo con las condiciones del cultivo, que repercutirá en el desarrollo de la larva. Por lo anterior, en este estudio se recomienda el uso de un indicador morfológico que sea factible de relacionarse con ese estadio tan importante en el desarrollo del abulón, y que pueda ser identificado y utilizado por los productores para incrementar las tasas de metamorfosis de las larvas.

Los cambios en la respuesta de las larvas con la edad para el inductor, a partir desde el momento en que se encontró competente para ser inducida a la metamorfosis, puede

explicar, en parte, la variabilidad en los resultados que se tienen en el proceso de producción de semilla. No obstante, de que el inductor que se use en un laboratorio sea siempre el mismo, el momento de la inducción puede variar por horas o un día, si se sigue el criterio de la ramificación en los tentáculos cefálicos. Puede no haber cambios morfológicos notables en 24 horas, pero si los habrá en la respuesta de la larva al inductor, y esto puede hacer la diferencia. Además, pueden ser causas de diferencias en el asentamiento y metamorfosis, la variabilidad gametogénica de la larva (Ault, 1982). En *Crassostrea gigas* se ha señalado que un mayor éxito en el asentamiento de las larvas puede ser producto de que la fertilización se realizó en el período óptimo del ciclo gametogénico (Lannan, 1980). Slattery (1992), encontró diferencias significativas en el asentamiento de las larvas de esta misma especie en un período de 8 meses, los cuales pudieron ser provocados por diferencias en la calidad de los gametos, en los sustratos inductores, como las diatomeas o el mucus y, por supuesto, la fauna bacteriana asociada.

En el caso del GABA, los valores siguieron una trayectoria asintótica, y se ajustaron a un modelo multiplicativo (Tabla IV, ver anexo), que fue muy diferente al comportamiento mostrado con las diatomeas bentónicas.

Cuando se usan diatomeas bentónicas como inductor, sería aventurado aseverar a que edad se obtendrá la mejor respuesta, ya que se desconoce cual es el mecanismo que en este caso activa el proceso de metamorfosis. El origen del cultivo de las diatomeas, su estadio de madurez, la especie o especies que componen el cultivo y las bacterias asociadas pudieran ser determinantes para que a un cierto estadio de desarrollo de la larva afecten la respuesta a la metamorfosis. Maki y Mitchell, (1985), encontraron, que la respuesta de las larvas competentes a películas de bacterias en superficies marinas, variaba con la edad de las larvas y la edad de dicha película. La película de bacterias puede influir en el asentamiento de larvas de invertebrados de diferentes maneras; al crear micro condiciones por cambios de pH (Mitchell y Young, 1972), o la síntesis de varios

compuestos que pueden inducir a la metamorfosis y que solo pueden ser producidos por bacterias muy específicas. La bacteria *Alteromonas colwellensis* produce L-DOPA y otros precursores de la melanina los cuales inducen a las larvas al asentamiento. En el caso de las diatomeas bentónicas, estas se encuentran asociadas a cianobacterias, las cuales producen ficobiliproteínas, como en las algas rojas, y se sugiere que los inductores pueden de alguna manera estar relacionados con la síntesis, función o degradación de las ficobiliproteínas, y sus precursores o productos de degradación (Morse, *et al.*, 1979b; Morse y Morse, 1984; Morse, *et al.*, 1984). Morse, *et al.*, (1984), encontraron que los inductores de *Haliotis* a la metamorfosis pueden ser separados y parcialmente purificados de las ficobiliproteínas, con las cuales ellas están inicialmente asociados, de una variedad de alga roja y cianobacterias.

La diferencia promedio máxima en la metamorfosis obtenida con GABA, entre un día y otro (34%), representa cantidades que son muy importantes cuando se trabaja con magnitudes de millones de larvas (Figura 6). Esto explica en buena medida las diferencias en la producción de juveniles entre una corrida y otra, aunque se utilice la misma técnica, pero con un cambio subjetivo en la apreciación del estadio de competencia de las larvas.

En este estudio, los inóculos de diatomeas para todos los recipientes, provinieron de un mismo cultivo, aunque obviamente cada día este cultivo era "más viejo". En el caso del GABA, las condiciones fueron completamente las mismas, ya que no hubo ninguna interferencia por diatomeas antes de la evaluación de la metamorfosis.

La capacidad de las larvas, de posponer su metamorfosis en ausencia de algún inductor, puede ser aprovechado para que sean inducidas cuando se espere su mejor respuesta. La larva de abulón tiene la capacidad de prolongar su etapa de desarrollo larvario y retrasar su metamorfosis, lo cual le permite a la larva buscar y seleccionar un sustrato adecuado para su desarrollo. Morse, *et al.*, (1979a, 1979b, 1980), señala que mantuvo larvas de *H. rufescens*, sin metamorfisarse en ausencia de inductores durante 3-4

semanas. Barlow (1990), indujo a la metamorfosis larvas de esa misma especie a los 20 días de edad. En el laboratorio del IIO-UABC, se han mantenido larvas de *H. rufescens* y *H. fulgens* por más de 18 días en agua de mar filtrada, hasta que terminaron sus reservas y murieron. Estas condiciones, permitieron mantener el cultivo de larvas hasta 12 días para llevar a cabo el experimento, y proporcionar además la ventaja de obtener mayores tasas de metamorfosis con la edad de las larvas. La característica de poder prolongar su vida larvaria, ha sido documentada para otros invertebrados (Scheltema, 1971). En especies como *Mytilus edulis* (Bayne 1965), *Aplysia juliana* (Kempf, 1981) , *Crassostrea gigas* (Coon, *et al.* 1990), algunos gastrópodos (Pechenik, 1984) y equinodermos (Strathmann, 1978), por mencionar algunos. Este retraso presenta además ventajas ecológicas, como la selección de un mejor sustrato para una mejor sobrevivencia de los juveniles (Crisp, 1974), intercambio genético entre poblaciones, (Scheltema, 1971) y la dispersión y colonización de nuevos habitats (Bayne, 1965; Pechenik, 1984).

En los testigos, donde las larvas se mantuvieron en ausencia de inductores, la metamorfosis obtenida, seguramente fue debida a que el agua de mar filtrada a 1 μm y pasada por UV, que se les cambió diariamente, no excluía sustancias disueltas que a muy baja concentración pudieran actuar como inductores al estar en contacto con las larvas. Sin embargo, los porcentajes de metamorfosis fueron bajos.

El mayor porcentaje de metamorfosis obtenido con el GABA en comparación con las diatomeas (Figura 6), se esperaba, pues en estudios realizados anteriormente en el mismo Instituto, consistentemente el GABA ha sido considerablemente más eficiente que las diatomeas, como se muestra en la siguiente tabla:

Metamorfosis de larvas de <i>Haliotis rufescens</i> utilizando diferentes inductores. Cada columna corresponde a un experimento independiente (* Promedio máximo obtenido en este estudio)			
INDUCTOR	METAMORFOSIS%		
Diatomeas	12	4	*37
Mucus	60	11	
KCl		73	
GABA	83	80	*96

Como parte de la rutina del Laboratorio de Moluscos del IIO, cuando se utiliza el GABA como inductor, se hace en ausencia de diatomeas bentónicas, y se obtiene del 80 al 100% (Searcy-Bernal, *et al.*, 1992). Después de 24 horas de aplicado el inductor, se inoculan los recipientes con diatomeas bentónicas, las cuales servirán de alimento. De esta manera, se evita una posible interferencia de las bacterias que estarían asociadas a las poblaciones de diatomeas bentónicas. Los resultados han sido bastantes consistentes y no se detectó ningún efecto adverso por el retraso del alimento que se les proporciona 24 horas después (García-Mendoza, 1991).

Son varios los autores que ha sugerido que las bacterias asociadas a microalgas interfieren con el GABA al usarlo como inductor, por lo que consideran necesario el uso de antibióticos para tener éxito en su aplicación (Morse, *et al.*, 1979a; Morse, 1990; Slattery, 1992). Estos autores obtuvieron una mortalidad casi total de las larvas durante y después de la metamorfosis cuando se utilizó GABA en ausencia de antibióticos, por lo que consideran indispensable su uso en el cultivo de larvas para tener éxito. Sin embargo, los resultados en este trabajo no coinciden con estos autores, seguramente debido a que la inducción con GABA se realizó en contenedores totalmente limpios (sin microalgas, ni bacterias), lo que pudo haber dado la diferencia. El resultado debido a el método de aplicación del GABA como inductor fue descrita anteriormente por Searcy-Bernal, *et al.*,

(1992). Kaspar, *et al.*, (1991), encontraron que degradadores del GABA son comunes en biopelículas sobre superficies disponibles para el asentamiento de las larvas de *Haliotis* y que una alta proporción de bacterias de las *Pseudomonadaceae* y *Neisseriaceae* aisladas fueron capaces de crecer con GABA como fuente de carbón. Los mismos autores señalan que este grupo en particular puede tener una gran significancia ecológica, ya que fue dominante en las biopelículas recientes formadas en los tanques de los laboratorios productores y fue el principal grupo degradador entre los aislados de las algas rojas incrustantes. Debido a estas bacterias marinas que pueden metabolizar el GABA, se puede reducir su concentración en el medio ambiente, de tal manera que tenga un efecto negativo en el asentamiento y metamorfosis, por encontrarse por debajo de los niveles óptimos para la inducción.

La naturaleza química de los inductores al asentamiento y metamorfosis, así como sus modos de acción sobre larvas específicas, han sido descritos en abulones, por los estudios ya mencionados por Morse, *et al.*, (1984) y Baloun y Morse (1984), en el molusco nudibranquio *Phestilla sibogae*, por Hadfield (1978, 1986); Hadfield y Scheuer, (1985) y Pennington y Hadfield (1989) y en ostiones, por Bonar, *et al.*, (1990), entre otros. Sin embargo, a pesar de detalles muy específicos que han sido descubiertos para estas especies, se han tenido que hacer amplias generalizaciones, y existen desacuerdos entre los investigadores, sobre la naturaleza y modo de acción de los inductores (Pawlik y Hadfield, 1990).

De acuerdo con Seki (1980), durante el asentamiento la larva de abulón *H. discus hannai*, al reptar eleva la parte dorsal terminal de su concha para que le sea posible tocar el sustrato con sus tentáculos cefálicos en busca de condiciones favorables. Cuando estas se presentan, la larva detiene su movimiento y la metamorfosis se inicia dentro de los siguientes 30 minutos cuando las células con cilios que componen el velo se desprenden a través de la cavidad del manto. La larva continúa reptando por ocho horas antes de

empezar a alimentarse y durante este período se inicia la formación de la concha peristomal. En el laboratorio del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC), se ha observado en tres ocasiones larvas con la presencia de concha peristomal y con vélum, como casos muy excepcionales. Cuando se evalúa la metamorfosis, para determinar si la larva perdió el vélum o este aún lo mantiene, es necesario que la larva esté activa y reptando, ya que cuando está retraída no se puede observar, lo cual hace muy lenta esta operación. Sin embargo, la presencia de la concha peristomal es más notable, por ser una característica totalmente externa (Figura 2). No obstante, debe de tenerse mucho cuidado cuando únicamente se manifiesta como un pequeño borde al extremo de la apertura de la concha. Luego será precedida por la concha midasimétrica que al crecer dará finalmente la forma ovalada ya conocida del abulón, para terminar de ser poslarva y pasar a juvenil al formarse el primer poro respiratorio, lo cual sucedió aproximadamente a los 45 días.

El tiempo de formación de la concha peristomal parece estar más relacionada con la edad de la larva al momento de ser inducida a la metamorfosis y la eficiencia del inductor en cuestión. Los porcentajes de poslarvas con concha peristomal encontrados 24 horas después de la inducción fueron muy elevados cuando se utilizó GABA, del 4% al 76% (Figura 6). En este caso los porcentajes siguieron un patrón muy similar a los de la metamorfosis, ya que en la medida que esta se fue incrementando, lo mismo sucedió con las conchas peristomales presentes. El incremento en los porcentajes de conchas peristomales con la edad de las larvas, y el hecho de que la diferencia entre el porcentaje de metamorfosis y conchas peristomales con la edad de la larva sea cada vez más pequeña, indica que un mayor porcentaje de larvas inició la metamorfosis en un tiempo más corto y más sincrónicamente, resultando como consecuencia con un mayor número de conchas peristomales presentes. Esto coincide con lo señalado por Barlow (1990), para la misma especie cuando usó GABA, ya que en sus observaciones encontró una respuesta más rápida en la formación de la concha peristomal cuando el porcentaje de metamorfosis fue

mayor y que correspondió a las larvas de más edad. En larvas de 7 días la pérdida del vélum ocurrió hasta 72 horas después. En las de 11 días a las 4 horas y las de 15 días dentro de la primera hora de la inducción. Sin embargo Barlow (1990), lo explica únicamente en términos de la edad y aunque en el caso del GABA se comporta de esta manera, no se debe generalizar, ya que los resultados obtenidos al usar diatomeas bentónicas como inductor esto no se cumplió de la misma manera. En este último caso, las conchas peristomales encontradas fueron muy pocas (Figura 7), y estuvieron ausentes en las primeras dos evaluaciones que se realizaron para las edades de 7 y 8 días. Sin embargo, se presentaron algunos indicios de incremento en el número de conchas peristomales con la edad, sin seguir la tendencia de los porcentajes de la metamorfosis, como sucedió con GABA. Entonces, el incremento en el número de conchas peristomales puede estar relacionado con la edad de las larvas en el momento de la inducción, y la eficiencia del inductor. Es evidente que las diatomeas bentónicas no son un inductor tan eficiente como el GABA, pues además de proporcionar menores porcentajes de metamorfosis, el menor número de conchas peristomales presentes indica que el efecto como inductor sobre las larvas competentes es más lento. Si las larvas respondieron a la metamorfosis 15 o 20 horas después de ser expuestas a las microalgas, no tuvieron tiempo suficiente para iniciar la formación de la concha peristomal antes de la evaluación, a las 24 horas.

6.2 Desarrollo de la Rádula

La información obtenida sobre la variación en la metamorfosis de las larvas con la edad y para cada inductor, permite entender mejor las variaciones que ocurren en los porcentajes de metamorfosis cuando se trabaja en un mismo laboratorio, a pesar de que se utilicen los mismos criterios y metodologías. Por lo tanto, el número de hileras de dientes en la rádula se propone como un mejor indicador de la competencia de la larva para incrementar los porcentajes de metamorfosis.

El desarrollo continuo de la rádula con la edad (Tabla V, ver anexo), permite que el número de hileras de dientes pueda ser utilizado como indicador del estado de competencia de la larva (Figuras 7 y 8). Al relacionar el número de hileras de dientes con los porcentajes de metamorfosis, se estableció primero para los valores más altos ya que son de mayor interés. En el caso del GABA, se consideró a la edad de 9 días (90.2%) como la más adecuada, ya que la diferencia con el mayor porcentaje obtenido (96%), no fue relevante. Además, sería inconveniente arriesgar el cultivo de las larvas, al mantenerlas más tiempo en el laboratorio y generaría más gastos. A esta edad, el número promedio de hileras de dientes en la rádula fue de 10, sin embargo, fluctuó entre 9 y 11. En Nueva Zelanda, cuando las larvas son competentes al asentamiento y metamorfosis, tienen de 6 a 8 hileras de dientes, sin embargo han observado que su sobrevivencia poslarval se incrementa cuando la inducción se realiza al presentar la rádula de 10 a 12 hileras de dientes (Tong y Moss, 1992). Se espera que a una temperatura más elevada que la de este estudio, el desarrollo larval se acelere y alcance el estadio antes señalado en menos tiempo y, por supuesto, suceda lo mismo con la rádula. Sin embargo, esto último no se comprobó experimentalmente. Considerando el análisis de la información generada, se recomienda que para determinar la competencia de la larva, para usar GABA como inductor, además de observar el comportamiento de reptación y nado alternado y las cuatro ramificaciones en los tentáculos cefálicos en la muestra de las larvas, por lo menos el 50% tenga en su rádula 10 hileras de dientes para obtener una mejor metamorfosis (Figura 6). Este señalamiento no será válido cuando se usen otros inductores ya que como se demostró anteriormente a una misma edad o desarrollo de la larva la respuesta variará en función del inductor. Seki (1980), realizó un estudio sobre el desarrollo larvario y poslarvario de *H. discus hammai*, en el cual señala que la formación de la rádula se lleva a cabo durante la metamorfosis, sin embargo este estudio realizado con *H. rufescens* y otro análisis con *H. fulgens*, indican que la formación y desarrollo de la rádula se lleva a cabo durante su etapa larvaria.

6.3 Crecimiento

El abulón es un gasterópodo de lento crecimiento y sus tasas de crecimiento presentan cambios importantes a lo largo de su vida. La variabilidad en el crecimiento se va haciendo mayor en la medida que incrementa su tamaño. Los cambios más importantes se llevan a cabo a partir de la etapa poslarval, donde el crecimiento en longitud los primeros 45 días es casi lineal (Figuras 9 y 10). Corresponde a este tiempo cuando finalmente aparece el primer poro respiratorio en la concha y es entonces cuando se le denomina juvenil. Después de los 45 días se observó un incremento en el crecimiento. Las tasas de crecimiento de las poslarvas obtenidas con GABA, se incrementaron de $25\mu\text{m}/\text{día}$ a $31\mu\text{m}/\text{día}$ después de los 45 días de edad y para las obtenidas con diatomeas bentónicas, el aumento fue mayor pasando de $21\mu\text{m}/\text{día}$ hasta $32\mu\text{m}/\text{día}$. Los organismos presentaron heterogeneidad en el crecimiento, de manera tal que los tamaños en cada medición fueron más diferentes, lo cual se hizo más evidente con el paso del tiempo, y se reflejó en el incremento de la desviación estandar (Figura 10). Este fenómeno es común también en otras especies. En el caso del abulón, siempre hay una parte de la población (15- 20%) que crece más lento y que en los laboratorios de producción comercial se elimina en los primeros meses por ser incosteable su rendimiento (Frank Oaks, Comunicación personal).

El rápido desarrollo inicial de la poslarva pudo haber sido motivado por el inductor a la metamorfosis, en el caso del GABA, como se citan arriba. De esto se puede deducir que el desarrollo inicial está influido por el inductor y la edad de la larva en el momento de la inducción. En el caso de las diatomeas bentónicas, donde la inducción fue menor, no se comportó de la misma manera. lo cual pudo deberse a la baja eficiencia o a la poca sincronía en la inducción. Por otro lado, al comparar las poslarvas obtenidas con ambos inductores, se observó un crecimiento promedio ligeramente superior a los 9 días para aquellos inducidos con diatomeas bentónicas (Tablas XI y XII, ver anexo). Esta

Biol. Frank Oaks. Abalone Farms Inc. P. O. Box 136 Cayucos, Cal. 93430. E.U.A.

recuperación rápida del crecimiento, puede deberse a la ventaja que representa para las larvas que al momento de iniciarse la metamorfosis encuentran disponible el alimento. Sin embargo, en la inducción con GABA, el alimento se les proporciona por medio de un inóculo al recipiente 24 horas después de la inducción, y hasta un día después se forma la película de diatomeas en las paredes del recipiente. En la medida que pasa el tiempo, las diferencias iniciales van desapareciendo, como consecuencia de la heterogeneidad en el crecimiento con la edad. La variabilidad en el crecimiento fue más notable, en las larvas inducidas con diatomeas bentónicas (Figuras 9 y 10). Al final del experimento las longitudes promedio fueron, 1903 μm y 1780 μm , con el mayor valor para las tratadas con GABA (Tablas XI y XII, ver anexo). Las diferencias ($p < 0.05$), se mantuvieron durante el estudio, para los crecimientos de los organismos obtenidos con diatomeas bentónicas los cuales manifestaron una mayor variabilidad en el crecimiento (Tabla XIV, ver anexo). En cambio, los obtenidos con GABA, presentaron menor variabilidad, de manera que en la última medición, no se encontraron diferencias (Tabla XIII, ver anexo). En la comparación de las medias de crecimiento para larvas inducidas a una misma edad pero con diferente inductor (Tabla XV), no se observa un patrón consistente o definido de una manera que las obtenidas con un inductor mostraran mayor crecimiento que las otras. Sin embargo el crecimiento promedio al final del estudio fue a favor del GABA, aunque por muy poco margen. Sin embargo, este hecho y la menor variabilidad presentada en el crecimiento (Tabla XI, ver anexo), puede representar una ventaja, sobre los abulones obtenidos al usar diatomeas bentónicas como inductor.

6.4 Sobrevivencia

Es ampliamente conocido como el primer mes posterior a la metamorfosis, es la etapa más crítica del ciclo de vida de estos organismos (Ebert y Houk, 1984). Sin embargo, la diferencia del 4% en la sobrevivencia a favor de las obtenidas con diatomeas a los 29 días (GABA, 4401 poslarvas y diatomeas bentónicas, 6261 poslarvas), adquiere una mayor

relevancia, si se considera que los porcentajes de metamorfosis obtenidos con diatomeas, fueron inferiores. Con GABA se obtuvo en la mayoría de los casos más del 90% de metamorfosis y con diatomeas bentónicas por debajo del 40%. Sería de esperar entonces, más del doble de poslarvas y juveniles obtenidos con GABA. Sin embargo, los datos señalan que las mortalidades fueron muy superiores en las poslarvas obtenidas con GABA. La diferencia promedio a los 64 días fue de 0.5% a favor de los juveniles obtenidos con diatomeas (Tablas XVI y XVII, ver anexo), lo que significa que por cada 1,000,000 de larvas inducidas a la metamorfosis, se obtendrán 5000 juveniles más, hasta esta etapa.

En esta etapa crítica de su vida intervienen varios factores en la mortalidad. La efectividad del inductor y el momento de la inducción, de manera que solo algunas larvas logran completar el proceso de metamorfosis y el resto muere, como se ha discutido en este trabajo. En el cambio a la vida bentónica, interactuarán con microalgas bentónicas las cuales serán su primer alimento, y de acuerdo a su composición, calidad y tamaño podrán ser de mayor o menor beneficio. En diferentes trabajos los investigadores coinciden que este es el elemento que más influye en la mortalidad de las poslarvas (Imai, 1967; Seki, 1980; Ebert y Houk, 1984; Garland *et al.*, 1985; McBride, 1990). Esto podría explicar en parte la mortalidad ocurrida, sin embargo, faltaría por saber que ocasionó la mayor mortalidad en las poslarvas obtenidas al usar GABA como inductor, ya que el alimento fue el mismo en todos los tratamientos. Estos resultados, no concuerdan con lo señalado por Morse (1979b), el cual determina que, con un inductor adecuado se incrementan las tasas de metamorfosis, se obtiene un desarrollo más rápido y mejora la sobrevivencia de la poslarva. Si bien se obtuvieron buenas tasas de metamorfosis y un desarrollo más rápido, como se comprobó con las conchas peristomales, finalmente la sobrevivencia a los dos meses fue ligeramente inferior que en los juveniles obtenidos al usar diatomeas bentónicas como inductor.

Además de los problemas nutricionales, existen otros genéticos u oogénicos (Morse, 1979a; Leighton, 1985). La película de microalgas, que sirve de alimento, está asociada a bacterias que de acuerdo con su composición y abundancia serán benéficas o perjudiciales para las poslarvas recién asentadas. Las bacterias, como ya se mencionó juegan un papel importante en el asentamiento de las larvas (Crisp, 1974; Scheltema, 1974; Brancato y Woollacott, 1982; Kirchman *et al.*, 1982), así como en su alimentación (Tong Y Moss, 1992). Sin embargo, es bien conocido que bacterias del tipo *Vibrio* provocan la muerte de larvas y poslarvas en un corto tiempo. Elston y Lockwood (1983), caracterizaron nueve diferentes bacterias del tipo *Vibrio* que provocaron infecciones y muerte a juveniles tempranos de *H. rufescens*. Estas posibilidades, como causas de mortalidad selectiva, de manera que ocurriera en las poslarvas obtenidas con GABA y no en las de diatomeas bentónicas, son desechadas, dada la composición aleatoria del experimento.

La sobrevivencia promedio (14%) del primer mes, en las poslarvas obtenidas con diatomeas bentónicas (Tabla XVII, ver anexo), fue superior a los obtenidos por Flores (1989), de 8.7% en 22 días, y por Searcy-Bernal *et al.*, (1988) de 0.8% en 10 días, y 13.7% en 22 días (Searcy-Bernal *et al.*, 1992), que trabajaron con la misma especie y en condiciones muy similares, y más bajos que Slattery (1987), que obtuvo un 56% en tres semanas, pero a muy pequeña escala, en cajas de petri. Los factores que influyen en el asentamiento y metamorfosis pueden tener efectos a largo plazo en el desarrollo y sobrevivencia de los juveniles (Slattery, 1992). En este estudio el experimento fue equivalente a la escala comercial, ya que algunos laboratorios comerciales de los EUA, producen los juveniles con esta técnica. (Thomas Edell, comunicación personal)

Ebert y Houk, (1984), obtuvieron, con la misma especie sobrevivencias de 1.9 a 13.7% en tres meses. Por lo tanto, las sobrevivencias obtenidas en este estudio pueden considerarse como buenas. Durante el segundo mes ocurrieron mortalidades importantes,

Thomas Edell. Abalone Unlimited, Inc. P.O. Box 730. Guadalupe Cal. E.U.A.

posiblemente debidas a incrementos en la temperatura. Los sementales provenientes de California están expuestos a una temperatura anual promedio de 15 ° C, y a esa misma temperatura se obtienen y desarrollan los juveniles. En cambio, en el laboratorio del IIO, durante la primavera la temperatura fue aumentando hasta alcanzar el 15 de marzo máximos de 19°C, cuando las primeras poslarvas apenas tenían de 7 a 14 días de edad. En abril, la temperatura llegó a subir hasta los 19.7°C. En experiencias de años anteriores, en el IIO, se llegaron a perder la totalidad de los juveniles de *H. rufescens* menores de 8 mm, que estuvieron sometidos a temperaturas de 20°C, por lo tanto, es posible que la sobrevivencia se afectara por esta razón, principalmente después de los 30 días, por lo que los datos deben de tomarse con reservas. Sin embargo, es factible hacer comparaciones entre los tratamientos, ya que las condiciones ambientales fueron las mismas para todos.

7. CONCLUSIONES

Los valores de metamorfosis fueron diferentes con la edad de la larva al momento de la inducción, principalmente los primeros días a partir de que estas se encontraron competentes. El efecto de la edad en la metamorfosis fue más evidente cuando se usó GABA, que diatomeas bentónicas como inductor. La mayor respuesta de metamorfosis se manifestó a diferente edad de las larvas para cada inductor. El GABA actuó más rápido, más sincrónico, y la metamorfosis fue casi tres veces superior que con diatomeas bentónicas. Sin embargo, a los dos meses esto no se reflejó en el número de juveniles obtenido, ya que ocurrió una mayor mortalidad en las poslarvas obtenidas con GABA. El crecimiento promedio de las poslarvas fue ligeramente superior y más homogéneo en las obtenidas con GABA, lo que puede ser una ventaja en comparación con las diatomeas bentónicas. El número de hileras de dientes en la rádula, presentó un incremento lineal, y es un mejor indicador que las cuatro ramificaciones en los tentáculos cefálicos para obtener mayores tasas de metamorfosis.

8. LITERATURA CITADA

- Akashige, S., Seki, T., Kan-no, H., y Nomura, T.. 1981. Effects of gama-aminobutyric acid and certain neurotransmitters of the settlement and metamorphosis of the larvae of *Haliotis discus hamai* ino. (Gastropoda), Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 43: 37-45.
- Ault, J. S.. 1982. Aspects of the Laboratory reproduction of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. M.S. Thesis, Humboldt State University, Arcata, CA, USA, 77 pp.
- Baloun, A. y D.E. Morse. 1984. Ionic control of metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). Biol. Bull. 167-138.
- Barlow, L. A.. 1990. Electrophysiological and behavioral responses of larvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*) to settlement-inducing substances. Bull. Mar. Sci. 46 (2): 537-554.
- Bayne, B. L.. 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). Ophelia 2: 1-47.
- Bonar, D. B., S. L. Coon, M. Walch, R. M. Weiner y W. Fitt. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous chemical cues. Bull. Mar. Sci. 46: 484-498.
- Brancato, M. S. y R. M. Woollacott. 1982. Effect of microbial films on settlement of bryozoan larvae (*Bugula simplex*, *B. stolonifera* and *B. turrata*). Mar Biol. 71: 51-56.
- Chia, F. S.. 1989. Differential larval settlement of benthic marine invertebrates. In J. S. Ryland & P. A. Tyler (eds): Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms. pp 3-12. Olsen & Olsen publ. Dinamarca.
- Chia, F. S., y R. Koss. 1978. Development and metamorphosis of the planktotrophic larvae of the *Rostanga pulchra* (Mollusca: Nudibranchia). Mar. Biol. 46: 109-119.
- Coon, S. L., W. K. Fitt y D. B. Bonar. 1990. Competency and delay of metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Mar. Biol. 106: 379-387.

- Crisp, D. J. 1974. Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae. En P.T. Grant and A. M. Mackie, eds. Chemoreception in marine organisms. Academic Press, London. pp 177-265.
- Chapman, R. W., J. A. Hey, C. A. Rizzo y D. C. Bolser. 1993. GABA_B receptors in the lung. Trends Pharmacol. Sci. 14: 26-29.
- Cropp, R.A.. 1989. Abalone Culture in Tasmania. Technical Report 37. Department of Sea Fisheries, Tasmania. Marine Laboratories Ed. Howel Williams. 26.
- Ebert, E.E. y Houk J.L.. 1984. Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. Aquaculture, 39: 375-392.
- Elston, R. y Lockwood, G.S.. 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone *Haliotis rufescens*. Swainson. S. of Fish Disease. 6: 111-128.
- Flores-Aguilar, R.A.. 1989. Estudio sobre la inducción al asentamiento y metamorfosis de larvas de abulón (*Haliotis rufescens* y *H. carrugata*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C., 54 pgs.
- García-Mendoza, E.. 1991. Comparación a escala piloto de técnicas de producción de semilla de abulón azul *Haliotis fulgens* Phillipi 1845: Inducción al asentamiento y metamorfosis, densidad inicial de larvas y primer alimentación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C., 104 pgs.
- Garland, C.A., Cooke, S.L., Grant, J.F., y McMeekin, T.A.. 1985. Ingestion of bacteria on and the cuticle of crustose (nonarticulated) coralline algae by post-larval and juvenile abalone (*Haliotis ruber* Leach) from Tasmanian waters. J.Esp. Mar. Biol. Ecol. 91: 137-149.
- Grant, J.F.. 1981. Abalone culture in Japan: development and current commercial practice. Tas. Fish. Res. 23: 1-17.
- Hadfield, M. G. 1978. Metamorphosis in marine molluscan larvae: an analysis of stimulus and response. pp 165-175 In F.S. Chia and M. E. Rice, eds. Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. Elsevier.

- Hadfield M. G.. 1986. Settlement and recruitment of marine invertebrates: A perspective and some proposals. *Bull. Mar. Sci.* 39: 418-425.
- Hadfield M.G. y D. Scheuer. 1985. Evidence for a soluble metamorphic inducer in *Phestilla*: ecological, chemical and biological data. *Bull. Mar. Sci.* 37: 556-566.
- Hahn, O.K.. 1989. Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. C.R.C. Press. Boca Raton.Flo. 348 pp.
- Hooker, N. y Morse, D.E.. 1989. Abalone: the emerging development of commercial cultivation in the United States. In *Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States*. Huner, S.V. and Brown, E. E. Eds., AVI Publishing Co 365 pp.
- Imai, T.. 1967. Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. *Venus* 25 (3): 159-167.
- Ino, T.. 1980. Fisheries in Japan. Abalone and Oyster, Japan Marine Products Photo Materials Assoc. Tokio. 165.
- Jaeckle, W.B. y Manahao, D.T.. 1989. Growth and energy imbalance during the development of a lecithotrophic molluscan larvae (*Haliotis rufescens*). *Biol. Bull.* 177: 237-246.
- Kan-no, H.. 1975. Recent advances in abalone culture in Japan. Proceedings of the First International Conference on Aquaculture Nutrition. University of Delaware: 195-211.
- Kaspar, H. F., Mountfort, D. O., y Pybus V.. 1991. Degradation of gamma-aminobutyric acid (GABA) by marine microorganisms. *Micobiology Ecology* 85: 313-318.
- Kempf, S. C.. 1981. Longed-lived larvae of the gastropod *Aplysia juliana*: do they disperse and metamorphose or just fade away?. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 6: 61-65
- Kirchman, D., S. Graham, D. Reish y R. Mitchell. 1982. Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua* (*Dexiospira*) *brasiliensis* Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *J. Exp Mar. Biol. Ecol.* 56: 153-163.
- Kohn, A. J. 1983. Feeding biology of gastropods. En. *The Mollusca, Vol.5, Phisyology, Part 2*, ed. A. S. M. Saleuddin & K. M. Wilbur, Academic Press, New York, pp. 1-63.

- Lannan, J. E.. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. I. Generic and environmental variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture*, 21: 323-336.
- Leighton, D.L.. 1972. Laboratory observations on the early growth of the abalone, *Haliotis sorenseni*, and the effect of temperature on larval development and settling succes. *Fishery Bulletin*. Vol. 70 N.2: 373-381.
- Leighton, D.L.. 1977. Some problems and advances in culture of Nort American abalones (*Haliotis*). *Proceedings of the Symposium of the Latin American Aquaculture Association, Maracay, Venezuela* 1-14.
- Leighton, D. L.. 1985. Early growth of green abalone in hatchery and field. *Proc. Joint International Scientific Diving Symp. La Jolla Cal.*
- Levitan, I B. y L. K. Kaczmarek. 1991. *The neuron: cell and molecular biology*. 450 pp Oxford Univ. Press. New York, USA.
- Maki, J. S. y R. Mitchell. 1985. Involvements of lectisin the setttlement and metamorphosis of marine invertebrate larva. *Bull. Mar. Sci.* 37: 675-683.
- McBride, C. S.. 1990. The relative effects of diet and irradiance on the growth and survival of poslarval red abalone *Haliotis rufescens*. M. Sc. Thesis. Dept. of Biology. San Jose State University. 45pp.
- McGeer, P. L. y E. G. McGeer. 1993. 13. Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. En: H. Narabayashi, T Nagatsu, N. Yanagisawa, and Y mizuno (eds). Raven press, Ltd., NY. 93-101.
- Mitchell , R. y Young, L. 1972. The role of microorganisms in marine fouling. *Off. Nav. Res. Contract*. U. S. Office of Naval Research. Washington, D. C. 23 pp.
- Montgomery, D. C., 1983. *Design and Analysis of Experiments*. 418 pp.
- Morse, D.E.. 1984. Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuables molluscs. *Aquaculture*, 39: 263-282.
- Morse, D. E.. 1990. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bull. Mar. Sci.* 46 (2): 465-483.

- Morse, D.E., H. Duncan, N. Hooker y A. Morse. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*. 196: 298-300.
- Morse, D.E., Hooker, N., Duncan., y Jensen, L.. 1979a. Gama-aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planctonic abalone larvae to settle an begin metamorphosis. *Science* 204: 407-410.
- Morse, D.E., Hooker, N., y Duncan,H.. 1979b. Induction of larval abalone settling and metamorphosis by gama-aminobutyric acid its congeners from crustose red algae:II: Applications to cultivation, seed production and bioassays; principal causes of mortality and interference. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 81-91.
- Morse, D.E., Tegner, M., Duncan, H., Hooker, N., Trevelyan, G., y Cameron, A.. 1980. Induction of settling and metamorphosis of planctonic molluscan (*Haliotis*) larvae. III. Signaling by metabolites of intact algae is dependent on contact in Chemical signaling in Vertebrate an Aquatic Animals. Muller-Schwarze, D., and Silverstein, R.M., Eds. Plenum Press, New York, 67 pp.
- Morse, A.N.C., y Morse, D.E.. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 75: 191-215.
- Morse, A.N.C., C. A. Froyd y D. E. Morse. 1984. Molecules from cyanobacteria and red algae that induce larval settlement and metamorphosis in the mollusc *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.* 81 (3): 293-298.
- Pawlik J. R. y M. G. Hadfield. 1990. A symposium on chemical factors that influence the settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: Introduction and Perspective. *Bulletin of Marine Sience*, 46 (2): 450-454.
- Pechenik, J. A.. 1984. The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *J. Exp. Biol. Ecol.* 74: 241-257.
- Pechenik, J. A. y W.D. Heyman. 1987. Using KCl to determine size of competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *J. Exp.Mar. Biol. Ecol.* 112: 27-38.

- Pennington, J. T. y M. G. Hadfield. 1989. Larvae of a nudibranch mollusc (*Phestilla sibogae*) metamorphose when exposed to common organic solvents. Biol. Bull. 177: 350-355.
- Saito, K.. 1981. The appearance and growth of O-year old Ezo abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47 (11): 1393-1400.
- Salas-Garza, A., y Searcy-Bernal. R.. 1992. Development and present status of abalone culture in Mexico. pp. 538-547. En. Abalone of the World; Biology, Fisheries and Culture. Eds by S. A. Shepherd, M. J. Tegner and S. A. Guzmán del Prío.
- Scheltema, R. S.. 1971. The dispersal of larvae of shoal-water benthic invertebrate species over long distances by ocean currents. 4th. European Marine Biol. Symp., Eds. D.S. Cris Camb. Univ. Press. 7-29.
- Scheltema, R. S.. 1974. Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. Thalassia Jugosl. 10: 263-296.
- Searcy-Bernal., Salas-Garza, A., y Flores-Aguilar, R.. 1988. Crecimiento de postlarvas y juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) en un laboratorio en México. Ciencias Marinas, 14 (4): 57-22.
- Searcy-Bernal, R., A. Salas-Garza, R. A. Flores-Aguilar and P. R. Hinojosa-Rivera. 1992a. Simultaneous comparison of methods for settlement and and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescens*). Aquaculture, 105 241-250.
- Searcy-Bernal, R., Salas-Garza, A., y Flores-Aguilar, R., 1992b. Research in Mexico on the critical stage of abalone (*Haliotis spp*) seed production.. pp 547-561. En. Abalone of the World; Biology, Fisheries and Culture. Eds by S. A. Shepherd, M. J. Tegner and S. A. Guzmán del Prío.
- Seki, T.. 1980. An advanced biological engineering system for abalone production. Proc. Inter. Symp. On Coastal Pacific Marine life. Oct 15-16. 1979. 45-54.
- Seki, T. y Kan-no, H.. 1981. Induced settlement of the japanese abalone, *Haliotis discus hannai*, véliger by the mucus trails of juvenile and adult abalones. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab., N. 43: 29-36.

- Shepherd, S.A., y Turner, J.A.. 1985. Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*). VI. Habitat preference, abundance and predators of juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 93: 285-298
- Slattery, M.. 1987. Settlement and metamorphosis of red abalone (*Haliotis rufescens*) larvae: a critical examination of mucous, diatoms and gama-aminobutiric acid (GABA) as inductive substrates. M. A. Dissertation, San Jose State University, California. 31 pp.
- Slattery, M.. 1992. Larval settlement and juvenile survival in the red abalone (*Haliotis rufescens*): an examination of inductive cues and substrate selection. Aquaculture; 102: 143-153
- Strathmann, R. R.. 1978. Length of pelagic period in echinoderms with feeding larvae from the Notheast Pacific. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 34: 23-27.
- Toffano, G. 1983. GABA receptor function. En: R. Caputto y C Ajmone Marsan (eds). Vol 10 ; neural trasmission, learning and memory. International Brain Research organization Monograph Series. Raven press NY. 97-103.
- Tong, L.J. y Moss, G. A. 1992. The New Zealand culture system for abalone. 583-591 pp. En. Abalone of the World; Biology, Fisheries and Culture. Eds by S. A. Shepherd, M. J. Tegner and S. A. Guzmán del Prío.
- Zar, J. H.. 1984. Biostatistical Analysis, 2nd edition. Prentice Hall, New Jersey.

ANEXO

Tabla I.-ANDEVA de dos vías, del experimento de inducción a la metamorfosis de larvas de diferentes edades (7-12 días), en el que se aplicaron como inductores; GABA y diatomeas bentónicas. ($\alpha= 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	6	36,632.22	6,105.37	94.77 **
EDADES	5	4,894.8	978.96	15.19 **
INDUCTORES	1	31,737.42	31,737.42	492.66 **
INTERACCION	5	2,197.32	439.46	6.82 **
RESIDUAL	24	1,546.07		
TOTAL	35			

Tabla II.-ANDEVA, y prueba de contrastes de Scheffe, de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con GABA, de larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha= 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS	5	5,742.16	1,148.43	17.34 **
DENTRO DE LOS GRUPOS	12	794.38	66.19	
TOTAL	17	6,536.54		
SCHEFFE				
Edad de la larva (días)	Conteos	Promedio	Grupos homogéneos	
7	3	43.26	*	
8	3	77.4	*	*
9	3	90.16	*	
10	3	90.36	*	
11	3	90.73	*	
12	3	95.93	*	

Tabla III.-ANDEVA, y prueba de contrastes de Scheffe, de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con diatomeas bentónicas, de larvas de diferentes edades. ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadratica	F calculada
ENTRE GRUPOS	5	1,349.97	269.99	4.31*
DENTRO DE GRUPOS	12	751.69	62.64	
TOTAL	17	2,101.66		
SCHEFFE				
Edad de la larva (días)	Conteos	Promedio	Grupos homogéneos	
7	3	11.26	*	
12	3	17.13	*	*
10	3	18.20	*	*
11	3	26.13	*	*
9	3	28.83	*	*
8	3	37.53		*

Tabla IV.-ANDEVA y prueba de contrastes de Scheffe de las conchas peristomales presentes 24 horas después de inducir a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días).($\alpha= 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS	5	10,659.79	2,131.95	7.23 **
DENTRO DE GRUPOS	12	3,538.22	294.85	
TOTAL	17	14,198.02		
SCHEFFE				
Edad de la larva (días)	Conteos	Promedio	Grupos homogéneos	
7	3	4.2	*	
11	3	35.26	*	*
8	3	41.73	*	*
9	3	61.6		*
10	3	68.23		*
12	3	76.96		*

Tabla V.-Ajuste al Modelo Lineal y Multiplicativo de los valores de metamorfosis de larvas de diferentes edades (7-12 días), inducidas con GABA.

MODELO LINEAL				
REGRESION				
Parámetro	Estimada	Error estandar	Valor T	Probabilidad
Intersección	54.47	7.54	7.21	0.00
Pendiente	8.02	1.93	4.14	0.00
ANDEVA				
FUENTE	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F calculada
Modelo	1	3,382.43	3,382.43	17.15 **
Error	16	3,154.1	197.13	
Coefficiente de correlación	0.72			
R ² =	52 %	Error estandar =		14.04
MODELO MULTIPLICATIVO				
REGRESION				
Parámetro	Estimada	Error estandar	Valor T	Probabilidad
Intersección	3.91	0.09	39.83	0.00
Pendiente	0.41	0.07	5.31	0.00
ANDEVA				
FUENTE	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
Modelo	1	1.14	1.14	28.21
Error	16	0.64	0.04	
Coefficiente de correlación	0.80			
R ² =	64	Error estandar =		0.20

Tabla VI.-ANDEVA y prueba de contrastes de Scheffe de las conchas peristomales presentes 24 horas después de inducir a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días).($\alpha=0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS	5	103.09	20.61	35.07 **
DENTRO DE GRUPOS	12	7.05	0.58	
TOTAL	17	110.14		
SCHEFFE				
Edad de la larva (días)	Conteos	Promedio	Grupos homogéneos	
7	3	0	*	
8	3	0	*	
9	3	1.06	*	
11	3	1.1	*	
12	3	4.4	*	
10	3	6.36	*	

Tabla VII.- Regresión lineal para los datos de longitud de poslarvas-juveniles de 9, 45 y 63 días de edad, que se obtuvieron al inducir a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días). (N = 108 organismos).

Edad de la larva en la inducción	Intersección	Pendiente	R ²
7	74.64	29.02	71 %
8	164.65	25.48	74 %
9	178.44	26.6	80 %
10	203.33	27.18	78 %
11	212.7	27.2	84 %
12	193.3	26.72	78 %

Tabla VIII.- Comparación de pendientes de las regresiones del crecimiento de las poslarvas-juveniles, de 9, 45 y 63 días de edad, que se obtuvieron al inducir a la metamorfosis, con GABA, a larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

	G7	G8	G9	G10	G11	G12
G7		*	*	*	*	*
G8			*	*	*	*
G9				*	*	*
G10					n.s.	*
G11						*
G12						

Tabla IX.- Regresión lineal de los datos de longitud de poslarvas-juveniles de 9, 45 y 63 días de edad, y obtenidas de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con diatomeas bentónicas (N = 108 organismos).

Edad de la larva en la inducción	Intersección	Pendiente	R ²
7	301.48	17.79	85 %
8	252.78	20.17	66 %
9	129.62	30.55	80 %
10	196.75	25.16	73 %
11	171.9	24.02	70 %
12	148.95	27.18	89 %

Tabla X.- Comparación de pendientes de las regresiones de crecimiento de las poslarvas-juveniles, obtenidas de larvas de diferentes edades (7-12 días), inducidas a la metamorfosis con diatomes bentónicas. ($\alpha=0.05$).

	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D7		*	*	*	*	*
D8			*	*	*	*
D9				*	*	*
D10					*	*
D11						*
D12						

Tabla XI.- Longitud promedio y Tasas de crecimiento de poslarvas-juveniles, obtenidos después de haber inducido a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días),

Edad de la larva en la inducción	9 días		45 días		63 días		Tasa de crecimiento (µm/día) 9-45 días	Tasa de crecimiento (µm/día) 45-63 días
	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)		
	Media	Des Est	Media	Des Est	Media	Des Est		
7	401	37	1,186	178	2,033	594	22	47
8	423	64	1,226	258	1,827	521	22	33
9	423	33	1,360	193	1,865	477	26	28
10	435	46	1,423	288	1,918	494	27	28
11	446	51	1,473	274	1,902	380	29	24
12	449	46	1,394	417	1,878	390	26	27
MEDIA	429		1,327		1,904		25	31

Tabla XII.- Longitud promedio y Tasas de crecimiento de poslarvas-juveniles, obtenidos después de haber inducido a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días).

Edad de la larva en la inducción	9 días		45 días		63 días		Tasa de crecimiento (µm/día) 9-45 días	Tasa de crecimiento (µm/día) 45-63 días
	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)		
	Media	Des Est	Media	Des Est	Media	Des Est		
7	460	29	1,107	343	1,419	231	18	17
8	456	28	1,096	264	1,567	493	18	26
9	430	59	1,428	343	2,106	489	28	38
10	465	34	1,204	245	1,866	533	21	37
11	441	46	1,094	227	1,792	529	18	39
12	429	46	1,268	190	1,932	535	23	37
MEDIA	447		1,199		1,780		21	32

Tabla XIII.- ANDEVA del crecimiento a los 9, 45 y 63 días, de poslarvas-juveniles, obtenidos de la inducción a la metamorfosis con GABA, de larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS 9 días	5	57,095.52	11,419.1	6.96**
DENTRO DE GRUPOS	210	344,340.81	1,639.71	
TOTAL	215	401,436.33		
ENTRE GRUPOS 45 días	5	2,321,266	464,253.17	5.02**
DENTRO DE GRUPOS	210	19,385,356	92,311.22	
TOTAL	215	21,706,622		
ENTRE GRUPOS 63 días	5	895,196	179,039.28	0.78
DENTRO DE GRUPOS	210	47,975,082	228,452.77	
TOTAL	215	48,870,278		

Tabla XIV.- ANDEVA del crecimiento a los 9, 45 y 63 días, de poslarvas-juveniles, obtenidos de la inducción a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, de larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS 9 días	5	44,126.5	8825.3	5.04**
DENTRO DE GRUPOS	210	367371.5	1,749.38	
TOTAL	215	411,498		
<hr/>				
ENTRE GRUPOS 45 días	1. 5	3,144,730	61,266.02	10.26**
DENTRO DE GRUPOS	210	12,866,064	61,266.97	
TOTAL	215	16,010,794		
<hr/>				
ENTRE GRUPOS 63 días	5	11,239,329	2,247,865.7	11.41**
DENTRO DE GRUPOS	210	41,363,498	196,969	
TOTAL	215	52,602,827		

Tabla XV.- Prueba t Student en la comparación del crecimiento promedio de juveniles obtenidos con larvas de diferentes edades (7-12 días), inducidas a la metamorfosis con los inductores; GABA y diatomeas bentónicas.

Comparación del crecimiento promedio a los 9 días después de metamorfosis		
Edad (días) de la larva al momento de la inducción	$t_{.05}$	p
D7 vs G7	-7.64	0.00 **
D8 vs G8	4.19	0.00 **
D9 vs G9	0.59	0.55
D10 vs G10	1.54	0.13
D11 vs G11	-0.34	0.72
D12 vs G12	-0.61	0.54
D7= juveniles obtenidos de larva de 7 días de edad inducida a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, etc..		
G8= juveniles obtenidos de larva de 8 días de edad inducida a la metamorfosis con GABA,		
Comparación del crecimiento promedio a los 45 días después de metamorfosis		
Edad (días) de la larva al momento de la inducción	$t_{.05}$	p
D7 vs G7	1.10	0.27
D8 vs G8	1.99	0.05
D9 vs G9	1.03	0.30
D10 vs G10	-4.36	0.00 **
D11 vs G11	-7.00	0.00 **
D12 vs G12	-1.79	0.08
Comparación del crecimiento promedio a los 63 días después de metamorfosis		
Edad (días) de la larva al momento de la inducción	$t_{.05}$	p
D7 vs G7	-7.10	0.00 **
D8 vs G8	1.78	0.08
D9 vs G9	2.69	0.01 *
D10 vs G10	-0.42	0.67
D11 vs G11	-0.97	0.33
D12 vs G12	-0.35	0.74

Tabla XVI.- Supervivencia de poslarvas-juveniles, obtenidos de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con GABA

Edad (días) de la larva en la inducción	S o b r e v i v e n c i a					
	29 días		45 días		63 días	
	No.	%	No.	%	No.	%
7	393	15.7	206	8.2	171	6.8
8	201	8	154	6.1	118	4.7
9	229	9.2	157	6.3	94	3.8
10	367	14.7	275	11	138	5.5
11	208	8.3	132	5.3	67	2.7
12	69	2.8	40	1.6	10	0.4
MEDIA	244	9.8	161	6.4	100	3.98

Tabla XVII.- Supervivencia de poslarvas-juveniles, obtenidos de larvas de diferentes edades (7-12 días), que fueron inducidas a la metamorfosis con diatomeas bentónicas.

Edad (días) de la larva en la inducción	S o b r e v i v e n c i a					
	29 días		45 días		63 días	
	No.	%	No.	%	No.	%
7	334	13.4	103	4.1	28	1.1
8	518	20.7	348	13.9	226	9
9	322	12.9	154	6.1	98	3.9
10	268	10.7	128	5.1	58	2.3
11	437	17.5	259	10.4	176	7
12	208	8.3	178	7.1	90	3.6
MEDIA	348	13.9	195	7.8	113	4.5

Tabla XVIII.-ANDEVA y prueba de contrastes de Scheffe de la sobrevivencia de las poslarvas, después de 29 días de haber inducido a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS	5	214,343.61	42,868.72	9.15 **
DENTRO DE GRUPOS	12	56,198	4,683.16	
TOTAL	17	270,541.61		
SCHEFFE				
Edad de la larva (días)	Conteos	Promedio	Grupos homogéneos	
12	3	2.7	*	
8	3	8.05	*	*
11	3	8.32	*	*
9	3	9.17	*	*
10	3	14.7	*	
7	3	15.72	*	

Tabla XIX.-ANDEVA de la sobrevivencia de las poslarvas después de 29 días de haber inducido a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS	5	190,489.83	38,097.96	1.94
DENTRO DE GRUPOS	12	234,848.67	19,570.72	
TOTAL	17	425,338		

Tabla XX.-ANDEVA de la sobrevivencia de las poslarvas, después de 45 y 63 días de haber inducido a la metamorfosis con GABA, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS 46 días	5	92,201.83	18,440.36	3.27 *
DENTRO DE GRUPOS	12	67,646.66	5,637.22	
TOTAL	17	159,848.5		
ENTRE GRUPOS 64 días	5	48,177.77	9,635.55	2.33
DENTRO DE GRUPOS	12	49,530	4,127.5	
TOTAL	17	97,707.77		

Tabla XXI.- ANDEVA de la sobrevivencia de las poslarvas, después de 45 y 63 días de haber inducido a la metamorfosis con diatomeas bentónicas, larvas de diferentes edades (7-12 días). ($\alpha=0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
ENTRE GRUPOS 46 días	5	127,990	25,598	1.73
DENTRO DE GRUPOS	12	177,554	14,796.16	
TOTAL	17	305,544		
<hr/>				
ENTRE GRUPOS 64 días	5	83,732.27	16,746.45	2.69
DENTRO DE GRUPOS	12	74,550.66	6,212.55	
TOTAL	17	158,282.94		