

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS



**“Anatomía interna y patrones bioquímicos
de *Panopea globosa* durante su desarrollo larval”**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

ALEJANDRA FERREIRA ARRIETA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO DEL 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS



**“Anatomía interna y patrones bioquímicos de
Panopea globosa durante su desarrollo larval”**

T E S I S

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL

GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ALEJANDRA FERREIRA ARRIETA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO DEL 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
MAESTRIA EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

"Anatomía interna y patrones bioquímicos de
Panopea globosa durante su desarrollo larval"

T E S I S

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ALEJANDRA FERREIRA ARRIETA

Aprobado por:



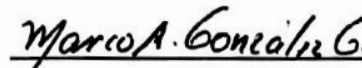
Dr. Zaúl García Esquivel

Director de tesis



Dra. Ivone Giffard Mena

Sinodal



M. C. Marco Aurelio González Gómez

Sinodal

Ensenada, B. C. México a 7 de enero del 2015

RESUMEN

Se evaluaron los cambios ontogénicos en la morfología interna y patrones bioquímicos en ovocitos y larvas de la almeja de sifón *Panopea globosa* con el fin de identificar los principales órganos funcionales, los sitios de acumulación de reservas energéticas, y la cantidad de lípidos y carbohidratos presentes en el ovocito (Ov) y las etapas de charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). Las larvas cultivadas en tanques cónicos de 500 L se muestrearon por triplicado para evaluar el crecimiento (longitud antero-posterior de la concha, peso seco, peso orgánico). Se tomaron además muestras entre 1,000 y 10,000 larvas para evaluar la anatomía interna mediante histología, así como localizar y cuantificar la cantidad de lípidos (triglicéridos, TG) y carbohidratos (CHOS) mediante histoquímica. Se utilizó tinción Policrómica para visualizar los órganos internos, así como Sudan Negro para visualizar TG y Azul alciano-Pas para CHOS. Se tomaron por triplicado muestras adicionales entre 4 a 34 mg para cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de proteínas, lípidos totales y carbohidratos totales. Las larvas presentaron un crecimiento lineal de la concha ($21 \mu\text{mdía}^{-1}$) y crecimiento exponencial del tejido, con valor adimensional del exponente entre 0.33 y 0.30. Histológicamente se encontró un sistema digestivo rudimentario en la fase ChaR formado por la boca, esófago y estómago. El estilete cristalino, intestino y glándula digestiva se observaron a partir de la fase UmT. No obstante, el desarrollo del saco del estilete se completó en la fase UmF. También en ésta fase dio inicio a formación de branquias, pie, glándula bisal, órgano apical y los dos músculos aductores. Histoquímicamente se evidenció que los sitios de almacenaje de los TG y CHOS están relacionados con el desarrollo del sistema digestivo. El órgano más importante de almacenamiento de reservas energéticas fue la glándula digestiva, donde se acumularon los TG y los CHOS en forma de gotas. El velo (exclusivamente TG) y el manto también fueron sitios secundarios de almacenaje. Los patrones bioquímicos evaluados cuantitativamente coincidieron con los evaluados histoquímicamente, lo que sugiere que esta última puede ser una herramienta importante de evaluación bioquímica. Se observó utilización de TG y CHOS de Ov a ChaR. Posteriormente los TG aumentaron linealmente hasta Pe, mientras que los CHOS se mantuvieron constantes en las fases umbonadas y se incrementan al final del periodo larval. Este es el primer trabajo donde se ha constatado que los niveles de CHOS pueden ser similares (fases umbonadas) o superiores (fase Ov, ChaR y Pe) a los TG lo que sugiere un papel importante como fuente de energía durante la metamorfosis de *P. globosa*.

PALABRAS CLAVE: *Panopea globosa*, larva, patrones bioquímicos, histología, histoquímica.

DEDICATORIA

A mis queridos padres:

Alfredo Ferreira Rodríguez

y

Olga Arrieta Santos

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a Dios por ayudarme en todo lo que hago y en especial por permitirme terminar este trabajo. Así mismo agradezco a mis padres, al Sr. Alfredo Ferreira Rodríguez y a la Sra. Olga Arrieta Santos por su comprensión, apoyo y su presencia a lo largo de esta maestría.

A la universidad Autónoma de Baja California por haberme permitido realizar mis estudios de Maestría, así como al Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

A CONACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

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

De la misma manera quiero agradecer a la Dra. Ivone Giffard Mena y al M. C. Marco Aurelio González Gómez por participar como sinodales de este trabajo.

Al personal del CIBNOR: En especial a la Dra. Fabiola Arcos Ortega por su apoyo y sugerencias de esta tesis, así mismo agradezco a la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y Sra. Eulalia Meza por su ayuda en los procedimientos histológicos e histoquímicos. También agradezco al M. C. Roberto Hernández Herrera por apoyar en el procedimiento de los análisis bioquímicos.

Así mismo deseo dar las gracias a Yoalli Romero Sánchez por ayudar en el muestreo, medición de organismos y fijación de las muestras.

De igual manera quiero dar las gracias al M. C. Alberto Gálvez por su asesoría en la utilización del microscopio y programas computacionales para la edición de fotografías.

Finalmente Agradezco a mi hermana Liliana Ferreira y a mi compañero Paul Villavicencio por su apoyo y comprensión durante esta carrera.

CONTENIDO

RESUMEN	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTENIDO	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
HIPÓTESIS	10
METODOLOGÍA	11
<i>Origen de la larva</i>	11
<i>Cultivo general de larvas</i>	11
<i>Crecimiento</i>	12
<i>Caracterización histológica</i>	13
<i>Caracterización Histoquímica</i>	13
<i>Caracterización Bioquímica</i>	15
<i>Análisis estadístico</i>	15
RESULTADOS	17
<i>Crecimiento</i>	17
<i>Caracterización histológica</i>	20
<i>Caracterización Histoquímica</i>	27
<i>Caracterización Bioquímica</i>	34

DISCUSIONES	40
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48
ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estadios de desarrollo larval de la almeja generosa <i>P. globosa</i> , reportado por Ferreira Arrieta et al. 2014: trocófora (A), larva de charnela recta (B), umbonada temprana (C), umbonada intermedia (D), umbonada tardía (E) y pediveliger (F).	12
2	Cambios temporales en la longitud de la concha (a), peso seco (b), y peso orgánico (c) de <i>P. globosa</i> . Se muestran las líneas de ajuste y sus ecuaciones en cada caso, los estadios de desarrollo también se indican: Ovocito (Ov), Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), Umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).	18
3	Ilustración de la orientación direccional de la anatomía de una larva de pectínido (modificada de Bower y Meyer 1990).	20
4	Ilustración interna de la larva veliger (prodisoconcha II) de <i>Crassostrea virginica</i> (modificada de Kennedy et al. 1996).	21
5	Tinción policrómica de sección transversal (A y B) y sección sagital (C) de la larva de charnela recta de 112 µm. La parte dorsal de la larva se encuentra orientada en la superficie de las imágenes (A, B y C). La boca (b) estómago (s), esófago (e) y velo (ve) son los órganos distinguidos en este estadio. También se indica el manto (ma), células germinales (cg) capa de células germinales del endodermo (cd) y capa de células del ectodermo (ct). La imagen A muestra bien definido el esófago, la imagen B muestra más claramente el estómago. En la imagen C se observa la boca. La barra equivale 20 µm.	22
6	Tinción policrómica de sección transversal (A), frontal (B) transversal oblicua (C), y sagital (D) de la larva umbonada final de 306 µm. En las imágenes A y D la parte dorsal de la larva está orientada en la superficie. En la imagen B y C la zona posterior se encuentra en la parte inferior. En esta fase además del manto (ma), estómago (s), esófago (eso) y velo (ve) se observa el órgano apical del velo (oa), boca (b), glándula digestiva (gd), estilete cristalino (ecr), saco del estilete cristalino (ss), desarrollo del pie (p), glándula bisal (gbl), secreción de biso (scr) músculo abductor anterior (mua) y el desarrollo inicial de las branquias (br). La barra equivale 50 µm.	24

7	Tinción policrómica de sección transversal (A), oblicua (B) y sagital (C) de la larva pediveliger de 355 μm . La zona dorsal de la larva se localiza en la parte superior de la imagen (A y B), en imagen C la parte dorsal se encuentra en la esquina superior derecha. Se observa el manto (ma), estómago (s), estilete cristalino (ecr), esófago (e), boca (b), velo (ve), órgano apical del velo (oa), desarrollo del pie (p), intestino (i), glándula bisal (gbl), secreción de bisco (scr) y formación de las branquias y saco del estilete cristalino (ss). La barra equivale 100 μm .	26
8	Localización de triglicéridos (TG) en ovocito y etapas larvales de <i>Panopea globosa</i> . Ovocito (A), Charnela recta (B), Umbonada temprana (C), Umbonada intermedia (D), umbonada final (E) y pediveliger (F y G). Secciones transversales (A, B, C, D, E y F) y sección sagital (G). Los órganos con TG incluyen el velo (ve), esófago (e), estómago (s), intestino (i) y manto (ma). Órganos identificados que no contienen triglicéridos: estilete cristalino (ecr), saco del estilete cristalino (ss), branquias (br), pie (p) y músculo abductor anterior (mua). Tinción Sudan Negro, 40X (A y B), 20X (C, D, E, F y G). La barra equivale a 50 μm .	29
9	Localización de carbohidratos (CHOS) en ovocito y etapas larvales de <i>Panopea globosa</i> . Ovocito (A), Charnela recta (B), Umbonada temprana (C), Umbonada intermedia (D), umbonada final (E y F) y pediveliger (G y H). Secciones transversales (B, C, D, E, F y G) y sección sagital (H). Los órganos/tejidos con CHOS incluyen la base del velo (ve), esófago (e), estómago (s), intestino (i), pie (P), glándula bisal (gbl), secreciones de la glándula bisal (scr), manto (ma), estilete cristalino (ecr), saco del estilete cristalino (ss) y células indiferenciadas (ci). Otros órganos identificados que no contienen CHOS branquias, glándula bisal (gbl) músculo abductor posterior). Tinción Azul Alciano Pas, 40X (A, B y C), 20X (D, E, F, G y H). La barra equivale a 50 μm .	32
10	Contenido relativo (%) de triglicéridos (TG) y carbohidratos (CHOS) en ovocitos y larvas de <i>Panopea globosa</i> evaluados histoquímicamente. Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).	34
11	Contenido peso-específico ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PS) de proteínas (PT), lípidos totales (LT), carbohidratos totales (CHOS) y triglicéridos (TG) de distintos estadios larvales de <i>P. globosa</i> . Ovocito (Ov), Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia	36

	(Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).	
12	Contenido peso-especifico ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO) de proteínas (PT), lípidos totales (LT), carbohidratos totales (CHOS) y triglicéridos (TG) de distintos estadios larvales de <i>P. globosa</i> . Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).	37
13	Contenido individual de proteínas (PT), lípidos totales (LT), carbohidratos totales (CHOS) y triglicéridos (TG) de distintos estadios larvales de <i>P. globosa</i> . Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).	38

LISTA DE TABLAS

1	Cambios en el diámetro promedio ($\pm$ error estándar) de las gotas de TG y CHOS en el ovocito y en la glándula digestiva de los distintos estadios larvales de <i>Panopea globosa</i> . Ovocito (Ov), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).	33
2	Comparación de la composición de carbohidratos (CHOS) en estadios tempranos (Vt = veliger temprana, ChaR = charnela recta) y premetamórficos (Pe = pediveliger) de larvas de moluscos bivalvos. Además de la edad, talla y estadio se muestra la temperatura (T) de cultivo.	46
3	Preparación de 100 ml de resina	57
4	Prueba de Kruskal-Wallis y Tukey para comparar el diámetro de las gotas de triglicéridos en los ovocitos y en glándula digestiva de estadios larvales de <i>P. globosa</i> ; ovocito (Ov), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).	63
5	Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el diámetro de las gotas de CHOS en glándula digestiva de las larvas de <i>P. globosa</i> ; umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).	64
6	Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el porcentaje de TG entre los ovocitos y los estadios larvales de <i>P.</i>	64

globosa; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

- 7 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el porcentaje de CHOS evaluados histoquímicamente en los ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 65
- 8 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de PT en los ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 65
- 9 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de CHOS en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 66
- 10 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de LT en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 66
- 11 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Kruskal-Wallis para comparar la composición de TG en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 66
- 12 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de PT entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 67
- 13 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de CHOS entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). 67
- 14 Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de LT entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia 68

(Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

- | | | |
|----|---|----|
| 15 | Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de TG entre estadios larvales de <i>P. globosa</i> ; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe). | 68 |
|----|---|----|

INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos se caracterizan por tener una vida larval planctónica y varios estadios de desarrollo morfológicamente distintos. Después de la embriogénesis los moluscos presentan el primer estadio larval, llamado trocófora, etapa caracterizada por la presencia de una corona de cilios que le sirve para nadar y respirar. Después aparece la forma “D”, también conocida como charnela recta o prodisoconcha I. En esta etapa, en muchas especies, se desarrolla la glándula digestiva y dos valvas (Ress 1950, Galtsoff 1964). A partir de este estadio son capaces de ingerir/digerir alimento particulado. Además de la corona ciliada, la larva tiene un velo que le sirve como órgano de natación y alimentación. Subsecuentemente se transforma en la forma umbonada, también conocida como prodisoconcha II, la cual se caracteriza por presentar una protuberancia en la parte anterior de la concha (Bayne 1976, Ralph 1999). La última etapa es la pediveliger o premetamórfica, caracterizada por la presencia de un pie que le sirve para arrastrarse en el sustrato en preparación para la metamorfosis. En las ostras la glándula del pie secreta una sustancia cementante que le permite fijarse sobre un sustrato, mientras que otras especies como los mejillones y pectínidos segregan un biso que le sirve para sujetarse temporalmente al sustrato para iniciar la metamorfosis (Helm et al. 2006).

La velocidad de desarrollo larval varía entre especies, y depende entre otras cosas de factores ambientales externos (temperatura, alimentación, salinidad, etc.) y endógenos (activación/producción de moléculas señalizadoras y relojes biológicos, capacidad de síntesis de proteínas entre otros). Los cambios morfológicos externos durante el desarrollo larval se han documentado mediante observación directa bajo el microscopio o a partir de fotografías/videograbaciones en las que se registra el tamaño,

forma de larva, locomoción y alimentación. Por otra parte los cambios anatómicos internos proveen información detallada sobre el grado de desarrollo de los órganos, y se documentan mediante cortes histológicos. La histología también es útil en el manejo y el diagnóstico de enfermedades. La preparación de muestras para histología consta de varios pasos a seguir, que incluyen fijación, deshidratación, inclusión en resina o parafina, corte, tinción, y montaje. Entre las tinciones más empleadas son hematoxilina-eosina y Tricómico de Mallory (Howard y Smith 1983) y entre otras recientemente utilizadas para describir la estructura y morfología de larvas de moluscos se han empleado la tinción policrómica, Tricrómica de Masson y Fulgen Azul de Picrometilo (Robles 2010). Los cortes histológicos y la aplicación de diferentes tinciones proporcionan información más precisa y detallada sobre la morfología del desarrollo larval.

El estudio de la composición bioquímica de larvas es una herramienta útil para conocer los patrones de acumulación de reservas y conocer de manera indirecta los requerimientos energéticos/nutricionales durante su desarrollo. La identificación del tipo de sustrato energético que usan preferentemente las larvas en su metabolismo se ha determinado a partir de experimentos de inanición controlada (Millar y Scott 1967, Holland y Spencer 1973) o mediante la cuantificación de la pérdida de reservas que tienen lugar durante la metamorfosis, un periodo de inanición natural (Videla et al. 1998, Labarta et al. 1999, García-Esquivel et al. 2001). Existen dos etapas críticas en las que el desarrollo y sobrevivencia larval de los bivalvos depende de las reservas de energía disponibles: La primera es el desarrollo embrionario, el cual depende de las reservas endógenas que los padres proporcionan a los huevos (Bayne 1973b) La segunda es la metamorfosis en donde la sobrevivencia postmetamórfica dependerá de

la cantidad/calidad de reservas acumuladas durante la vida larval y del gasto energético asociado a la metamorfosis (Whyte et al. 1989, 1990).

Las proteínas, lípidos y carbohidratos son las principales macromoléculas energéticas de reserva en organismos terrestres y marinos (Lucas y Southgate 2012). Está documentado que los lípidos son la reserva de energía más importante en los huevos y larvas de moluscos bivalvos (Spencer 2008), mientras que en la metamorfosis los lípidos o las proteínas pueden ser el principal sustrato de energía. Así mismo los carbohidratos corresponden al componente bioquímico con menor contribución porcentual durante la etapa larval (Videla et al. 1998, Mann y Gallagher 1984, Whyte et al. 1987), pero es el sustrato que se moviliza más rápido para ser utilizado. Se han sugerido tres tipos de estrategias para la adquisición y utilización de energía en larvas de moluscos bivalvos (García- Esquivel 2000), las cuales están representadas por especies modelo de la siguiente manera: (1) durante la embriogénesis del ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, los lípidos son utilizados y las proteínas son acumuladas. En post-embriogénesis la energía es adquirida a partir del alimento externo, y durante las metamorfosis las proteínas endógenas contribuyen más que los lípidos a la energía total demandada en esta etapa crítica de desarrollo (García-Esquivel et al. 2001). (2) La larva de la ostra europea *Ostrea edulis* utiliza proteínas endógenas y acumula los lípidos durante el desarrollo larval, mientras que en la metamorfosis los lípidos son utilizados como fuente principal de energía. (3) En el caso de la escalopa *Patinopecten yessoensis*, tanto las proteínas como los lípidos son acumulados durante el desarrollo larval, pero no está claro cuál fuente de energía endógena es utilizada preferentemente en la metamorfosis, aunque aparentemente ambas tienen una contribución significativa (García-Esquivel 2000). En general, se

sabe que el proceso de metamorfosis es energéticamente muy demandante en moluscos bivalvos, ya que la larva consume entre el 50 y 65 % del total de las reservas energéticas endógenas. Esto debido a que son incapaces de ingerir alimento, en esta etapa hay una reubicación de la boca y el ano, lo cual le impide la ingestión temporal de partículas. Además la larva metamórfica mantiene una intensa actividad anabólica y demanda de energía para la síntesis de nuevos órganos y el catabolismo de otros (Videla et al. 1998, Labarta et al. 1999, García-Esquivel et al. 2001).

La evaluación de los patrones bioquímicos se realiza mediante métodos cuantitativos y semicuantitativos. En el primer caso se cuantifican los componentes bioquímicos gravimétricamente o espectrofotométricamente, mientras que en el segundo se emplean técnicas de histoquímica. Las principales moléculas energéticas que se encuentran presentes en los moluscos son en orden de abundancia: las proteínas (24 kJ g^{-1}), lípidos (39 kJ g^{-1}) y carbohidratos (17 kJ g^{-1}) (Gnaiger, 1983). Las proteínas tienen primordialmente una función estructural, mientras que los lípidos, y en particular los triglicéridos, son reservas energéticas de uso a mediano plazo. Los carbohidratos son de uso más inmediato y se almacenan generalmente en forma de glucógeno. Los órganos de almacenaje de reservas están claramente identificados en moluscos bivalvos adultos, pero se tiene muy poca información en estadios larvales. En este sentido, Gallagher et al. 1986 reportó que los lípidos larvales del ostión *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* y la almeja *Mercenaria mercenaria* se encuentran presentes en forma de pequeñas gotas. Otros trabajos sobre patrones bioquímicos exhibidos por larvas de moluscos se han enfocado en la evaluación espectrofotométrica de proteínas, lípidos y carbohidratos utilizando métodos

microanalíticos para la extracción de dichas moléculas en tejidos larvales (Whyte et al. 1987, Mann y Gallager 1985, Holland 1973, Chaparro et al. 2006, Labarta et al. 1999).

Las macromoléculas energéticas también se pueden visualizar directamente en el tejido de organismos utilizando métodos histoquímicos específicos. Se usan colorantes del grupo de los Sudanés (Gabe 1968), Aceite rojo O, Sulfato de Azul Nilo (Cain 1947) para la detección de lípidos, mientras que la tinción con azul alciano y reactivo de Schiff (Azul Alciano – PAS) es la más utilizado para teñir los carbohidratos (mucinas) neutros y ácidos (Palomo 1960). Las mucinas están definidas como moléculas con un núcleo central de proteína y múltiples cadenas (60 a 80%) de carbohidratos, y se les llama también glicoproteínas (Reid y Clamp 1978). Las mucinas ácidas se definen como moléculas que contienen carbohidratos con grupos carboxilo (COOH) o sulfonados (SO₃H) que se ionizan a un pH fisiológico confiriéndole una carga negativa a la molécula. Las mucinas neutras contienen cadenas de carbohidratos sin grupos ácidos, y su carga neta a un pH fisiológico. . El colorante azul alciano preparado a un pH de 2.5 tiñe ampliamente las mucinas o carbohidratos ácidos, y el color azul resultante es insoluble en agua o alcohol y no se decolora apreciablemente con el tiempo. Por otra parte las mucinas neutras son exclusivamente PAS-positivas (periodic acid-Schiff), ya que el reactivo de Schiff reacciona con los grupos aldehídos de los monosacáridos, los cuales se tiñen de color púrpura-magenta que contrasta con el azul de las mucinas ácidas. La técnica de PAS se utiliza ampliamente para detectar mucinas neutras además de glucógeno y varias glicoproteínas. Finalmente, el color de la mezcla de mucinas depende del carbohidrato dominante (Mowry 1963). Diferentes reacciones como la de Millon, diazoica, xantoproteica, y Sacaguachi, son las técnicas utilizadas para la estimación de

proteínas (Palomo 1960). Todas estas reacciones determinan únicamente una fracción de los aminoácidos constituyentes de cualquier proteína en particular (Palomo 1960). Finalmente, el colorante Sudan negro se utiliza para teñir los triglicéridos de un color negro-azulado (Bayliss y Adams 1972).

ANTECEDENTES

En Baja California existen dos especies de almeja de sifón; *P. generosa* la cual se distribuye en la costa noroeste de México y *P. globosa* con se ubica desde el alto Golfo de California hasta Bahía Magdalena. A partir 2008 se inició la producción experimental de semilla de almeja generosa en el laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Estableciendo la producción sistemática de ambas especies en laboratorio desde 2010.

La mayor parte de los trabajos publicados hasta ahora sobre larvas del género *Panopea*, son sobre *P. generosa*. Por ejemplo Tapia-Morales (2011) estudió el efecto dos antibióticos sobre el crecimiento y sobrevivencia de esta especie, y concluyó que el cloranfenicol tuvo un mejor efecto en el desarrollo larval que la gentamicina. Por otra parte, Buitimea-Álvarez (2011) probó combinaciones de salinidad y temperatura para observar su efecto sobre el desarrollo larval de *P. generosa*, y observo que estas crecieron más rápido a 18 y 20 °C y en salinidades de 27, 30 y 33 ppm. Recientemente Montes-Orozco (2014) estudió el efecto de dietas monoalgales y combinadas de *Isochrysis* spp. y *Chaetoceros calcitrans* en el desarrollo larval de la almeja *P. generosa*, y encontró que las larvas mostraron mejor crecimiento y sobrevivencia con la dieta monoalgal de *Isochrysis sp* o con la dieta mixta.

Por otra parte la duración del periodo larval en el género *Panopea* ha sido también estudiado. Por ejemplo, *P. zelandica* tiene un periodo de 17 días y una talla de asentamiento de 250 µm (Gribben 2003). En *P. generosa* está reportado un período larval de de 30 a 47 días, y una talla de metamorfosis de 380 µm (Goodwin et al. 1979). Finalmente *P. globosa* presenta una etapa larval más corta (12 a 13 días) y una talla de

asentamiento de 330 a 350 μm por lo que su velocidad de desarrollo es relativamente rápida (Ferreira-Arrieta et al. 2014).

Los estudios sobre la anatomía interna de larvas de moluscos son más limitados, y en particular para el género *Panopea* solo existe un estudio disponible hasta la fecha. Bower y Blackbourn (2003) reportaron que el periodo larval de *P. generosa* dura 17 días. El inicio del desarrollo del esófago, estómago y velo se observó partir de los 2 días de edad larval. A los 7 días se alcanza a diferenciar el intestino y la glándula digestiva. A los 14 días de edad apareció el órgano apical, e inicio el desarrollo del musculo aductor anterior. También se observaron células indiferenciadas destinadas para la formación de las branquias y pie. Las larvas pediveliger de 17 días desarrollan el musculo aductor posterior y el pie, así como la glándula del biso (Bower y Blackbourn, 2003). Cabe mencionar que el periodo larval reportado por estos autores fue mucho más corto que los 30 o 47 días indicados previamente por Goodwin et al. (1979). Hasta la fecha no hay estudios disponibles sobre la ubicación de los principales órganos de reservas energéticas presentes en las larvas de muchos bivalvos, incluyendo las especies del género *Panopea* reportadas hasta ahora.

En relación a las moléculas energéticas, se sabe que las proteínas son el componente bioquímico más abundante en larvas y adultos de moluscos, seguido por los lípidos y los carbohidratos. Se ha reportado que los huevos de muchos bivalvos contienen entre 8 - 55% de proteínas, mientras que las fases larvales finales presentan 10 - 26%. Los lípidos están presentes en menor proporción. En los huevos su contenido es de 3-21% mientras que en fases finales es de 2-18%. Los carbohidratos representan los menores porcentajes, entre 1-8 y 0.5-8 % en huevo y estadios finales respectivamente (Holland y Spencer 1973; Labarta et al. 1999; Pernet et al. 2006;

Laing y Utting 1994; Mann y Gallagher 1985). Hasta ahora no se han realizado estudios sobre la cantidad de reservas energéticas acumuladas durante cualquiera de las fases larvales en especies del género *Panopea*, o sobre los órganos que utilizan las larvas para almacenar dichas reservas. Tal información es importante para poder comprender las estrategias de acumulación de reservas energéticas en las larvas de esta especie e identificar las fuentes potenciales de alimento que se pueden usar en condiciones de cultivo.

Aunque ya están documentados los distintos estadios de desarrollo, la sobrevivencia y el crecimiento de *P. globosa* durante su fase larval (Ferreira-Arrieta et al. 2014), no existen hasta ahora reportes sobre el desarrollo morfológico interno, composición bioquímica o la localización de reservas durante el desarrollo ontogénico de esta especie. Dicha información es necesaria para poder conocer con mayor detalle las limitantes anatómicas que tiene *P. globosa* para la adquisición/procesamiento de alimento durante su desarrollo temprano, así como para identificar el tipo/cantidad de reservas energéticas que acumula durante su desarrollo larval y los sitios de almacenaje de las mismas. Esta información ayudará a comprender no solamente las adaptaciones evolutivas de *P. globosa* sino también proveerá información que puede ser usada para mejorar la producción de semilla de *P. globosa* en laboratorio a partir de un mejor manejo de las larvas en el laboratorio, lo cual puede resultar en una mayor sobrevivencia.

OBJETIVO GENERAL

Documentar el desarrollo morfológico interno, composición bioquímica y localización de reservas energéticas durante el desarrollo ontogénico de *P. globosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir la anatomía interna de *P. globosa* durante su desarrollo larval.
- Identificar los sitios principales de acumulación de reservas energéticas y el sustrato energético dominante que presentan las larvas de *P. globosa* durante su desarrollo.
- Cuantificar los niveles y el patrón de acumulación de reservas energéticas en los ovocitos y desarrollo larval de *P. globosa*.
- Establecer la relación entre los niveles de reservas energéticas presentes en órganos específicos y el grado de desarrollo larval.

HIPOTESIS

- La cantidad de reservas energéticas acumuladas por las larvas de *P. globosa* está directamente relacionada con el grado de desarrollo del sistema digestivo.
- Los lípidos y carbohidratos se acumulan como material de reserva en forma dispersa y en todos los órganos de las larvas de *P. globosa*.
- Los lípidos son la principal reserva energética acumulada durante el desarrollo larval de *P. globosa*, en preparación para la metamorfosis.

METODOLOGÍA

Origen de la larva

Las larvas usadas en este estudio fueron obtenidos a partir de un desove de 22 organismos de *Panopea globosa* (14 hembras y 8 machos) realizado en el laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (Universidad Autónoma de Baja California). La obtención de gametos se obtuvo mediante inducción química utilizando el método patentado por García-Esquivel (expediente IMPI MX/a/2010/012096; folio Mx/E/2010/068613) y la fertilización e incubación de los huevos se realizó por métodos tradicionales (Helm et al. 2006).

Cultivo general de larvas

Una vez que las larvas alcanzaron la fase veliger temprana “D” (24 hrs después de la fertilización), se transfirieron a tanques cónicos de 500 L con una densidad de 3 larvas ml⁻¹ y se mantuvieron a temperatura de 22 ± 1 °C. Las larvas fueron alimentadas con la microalga *Isochrysis galbana* (Clon T-iso) a concentraciones de 5 – 60x10³ cel.ml⁻¹ dependiendo de la talla. Cada 48 horas se recambió el agua y se registró la edad, talla y forma de la larva. Se tomaron muestras triplicadas de los ovocitos y de cada una de las fases distintivas de desarrollo larval (charnela recta, umbonada temprana, umbonada intermedia, umbonada final y pediveliger) de *P. globosa* para evaluar el crecimiento, bioquímica, histología e histoquímica. Las fases de desarrollo indicadas se identificaron de acuerdo a Ferreira-Arrieta et al. 2014 (Fig. 1).

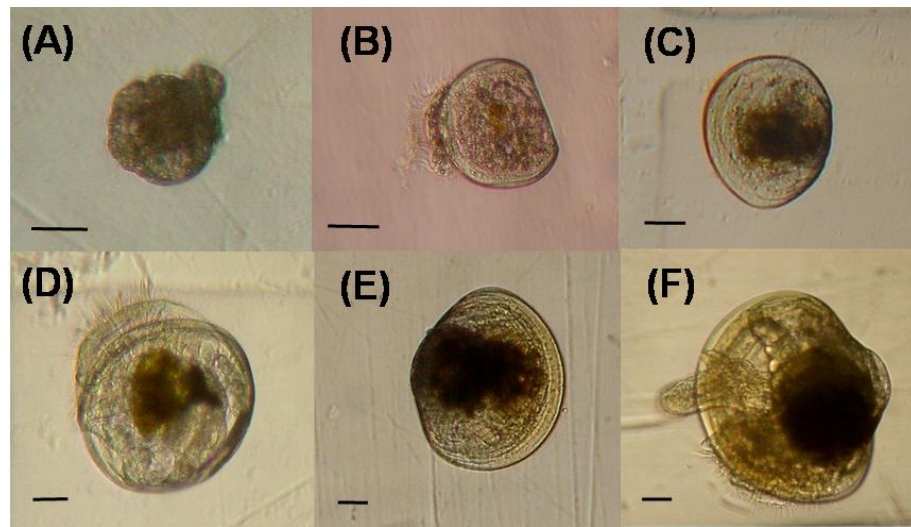


Fig. 1. Estadios de desarrollo larval de la almeja generosa *P. globosa*, reportado por Ferreira Arrieta et al. 2014: trocófora (A), larva de charnela recta (B), umbonada temprana (C), umbonada intermedia (D), umbonada tardía (E) y pediveliger (F).

Crecimiento

En cada fecha de muestreo se midió la longitud de la concha (eje antero-posterior) de 30 larvas utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss). Para la determinación de peso seco (PS) y peso orgánico (PO) se colectó por quintuplicado entre 300 y 3,000 larvas (dependiendo de la talla), se contaron bajo el microscopio, y se filtraron en filtros watman GF/C de 25 mm previamente calcinados y pesados y las sales se eliminaron con agua destilada. Para el PS las muestras se secaron en una estufa a 60 °C durante 24 h y para el PO se calcinaron en una mufla a 450 °C durante 24 h. El peso seco se obtuvo como la diferencia del peso del filtro y del filtro mas muestra. El peso orgánico se obtuvo por diferencia del peso seco y el peso calcinado.

Caracterización histológica

En cada fecha de muestreo se colectaron por triplicado en microtubos de 1.5 mL entre 1,000 y 10,000 larvas. Se eliminó el agua de mar con agua destilada y se añadió 1 ml de solución de Karnovsky para fijar la muestra, la cual se mantuvo a 4 °C hasta su procedimiento histológico en el Laboratorio de Histología e histoquímica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Antes del procesamiento histológico se realizó la descalcificación de las larvas con HCL al 10%. Las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y posteriormente fueron embebidas en resina (Anexo 1). Se realizaron cortes de 2 µm con un micrótopo (Leica Rm 2155, Leica Microsystems) y estos se montaron en portaobjetos y se tiñeron con la tinción policrómica (Anexo 1). Las muestras se examinaron bajo un microscopio (Olympus BX 50) y se identificó la anatomía interna de la larva tomando como referencia otras larvas de moluscos bivalvos (Galtsoff 1964; Elston 1980; Gustafson y Reid 1988; Bower y Meyer 1990; Bower y Blackburn 2003; Kennedy et al. 1996).

Caracterización histoquímica

El procedimiento fue similar a la caracterización histológica con la diferencia de que para fijar y preservar las larvas se añadió 1 mL de solución de Davidson (Shaw y Battle 1957) y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su posterior análisis en CIBNOR.

Antes de iniciar con el procedimiento histoquímico las larvas se descalcificaron con HCL al 10%. Posteriormente se deshidrataron con alcohol etílico y se aclararon los tejidos con xileno (Anexo 2). Las muestras fueron infiltradas con parafina y se

realizaron cortes de 4 μm con un micrótomó automático (Leica RM 2155). Estos fueron desparafinados posteriormente con xilol y etanol (Anexo 2). Enseguida un set de cortes se tiñó con Sudan Negro para la evaluación de lípidos (triglicéridos) y otro set de cortes se tiñó con Azul Alciano Pas para la evaluación de carbohidratos (Anexo 2). Los cortes teñidos se dejaron secar durante 1 día a temperatura ambiente y se montaron con gelatina glicerizada. Posteriormente se observaron bajo el microscopio (Olympus BX 50) y se tomaron entre 30 y 50 imágenes de cortes diferentes de cada muestra con una cámara digital integrada (CoolSnap-Pro Color). El contenido relativo de triglicéridos y carbohidratos se cuantificó en las imágenes digitales (se escogieron entre 5 y 28 cortes trasversales de cada estadio larval que tuvieran los órganos lo mas definidos posibles, en los cuales se situaron los componentes bioquímicos) mediante el software Image Pro Plus, versión 6. Se cuantificaron los píxeles coloreados correspondientes a los lípidos o carbohidratos y se estimó su porcentaje de cobertura dividiendo los píxeles entre los píxeles totales correspondiente a la larva.

Adicionalmente, se midió el diámetro de las gotas de triglicéridos y carbohidratos que aparecieron en ovocito y en la glándula digestiva de las larvas utilizando el programa Image Pro Plus 6., después de haber calibrado con un micrómetro de referencia (Arcos-Ortega et al, en prensa). Para esto se escogió entre 5 y 15 imágenes diferentes de cada estadio y se evaluaron por lo menos la formación de 15 gotas del componente bioquímico.

Caracterización bioquímica

Para cuantificar espectrofotométricamente los lípidos, carbohidratos, proteínas y triglicéridos se colectaron por triplicado entre 3,500-180,000 organismos vivos (4 y 34 mg peso seco total) en tubos eppendorf de 1.5 mL. Para eliminar sales se adicionó formato de amonio en los huevos mientras que para las muestras de larvas se utilizó agua destilada. Las muestras se criopreservaron a -80 °C durante aproximadamente 5 meses. Posteriormente las muestras fueron liofilizadas a -50 °C y transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de Bioquímica Fisiológica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para su posterior análisis.

Los niveles de proteínas totales (PT) se determinaron con el método de BCA (Brown et al. 1989). Los lípidos totales (LT) mediante el método de vainillina (Barnes y Blackstock 1973), carbohidratos (CHOS) mediante el método de antrona (Roe et al. 1955) y los triglicéridos (TG) se evaluaron a partir del método enzimático GPO-PAP (Anexo 3).

Análisis estadístico

Se utilizaron regresiones lineales para establecer la relación tiempo-longitud, longitud-peso seco, longitud-peso orgánico y peso seco-peso orgánico de las larvas. Asimismo se hicieron ajustes potenciales para definir las relaciones tiempo-peso orgánico y tiempo-peso seco. La significancia de las regresiones se estimó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una probabilidad (P) de 0.05.

Los porcentajes relativos de TG y CHOS (histoquímica) fueron transformados con arco seno y posteriormente se evaluó el efecto de los estadios de desarrollo larval

sobre la composición bioquímica mediante un análisis de varianza simple (ANOVA), teniendo como tratamiento los estadios de desarrollo y como variable de respuesta el contenido bioquímico. Cuando las diferencias entre tratamientos resultaron significativas se aplicó una prueba de Tukey ($p < 0.05$) para realizar contrastes múltiples de los promedios.

Para determinar si existen diferencias significativas en el tamaño de diámetro de las gotas de triglicéridos y carbohidratos en los ovocitos y en glándula digestiva en función de la edad (estadio) de las larvas se aplicó ANOVA simple, seguido por la Prueba de Tukey cuando el ANOVA resultó significativo. En los casos donde no se cumplieron las condiciones de normalidad u homogeneidad de varianza se aplicó la prueba no paramétrica de rangos Kruskal-Wallis. Se aplicaron correlaciones de Pearson para establecer si existía una relación significativa entre el tamaño de las gotas de CHOS o TG (histoquímica) y la longitud de la larva.

En la caracterización bioquímica (PT, LT, TG y CHOS) se aplicó el mismo procedimiento estadístico que en histoquímica solo que las pruebas se aplicaron en los datos no transformados.

RESULTADOS

1. Crecimiento

Los ovocitos de *P. globosa* mostraron una talla promedio de 86 μm de diámetro mientras que las larvas de charnela recta de 2 días de edad exhibieron una longitud antero-posterior de 112 μm (Fig. 2a). La pendiente de la recta fue de 21.04 $\mu\text{m}.\text{día}^{-1}$ (Fig. 2a, $F= 371.42.0$, $p < 0.001$). A los 13 días de edad, las larvas alcanzaron el estadio pediveliger, con una longitud promedio de 355 μm (Fig. 2a). El peso seco y peso orgánico de las larvas aumentaron exponencialmente con el tiempo, y la ecuación de ajuste para esas variables arrojó un valor del exponente de 0.33 y 0.30 respectivamente (Fig. 2b y 2c).

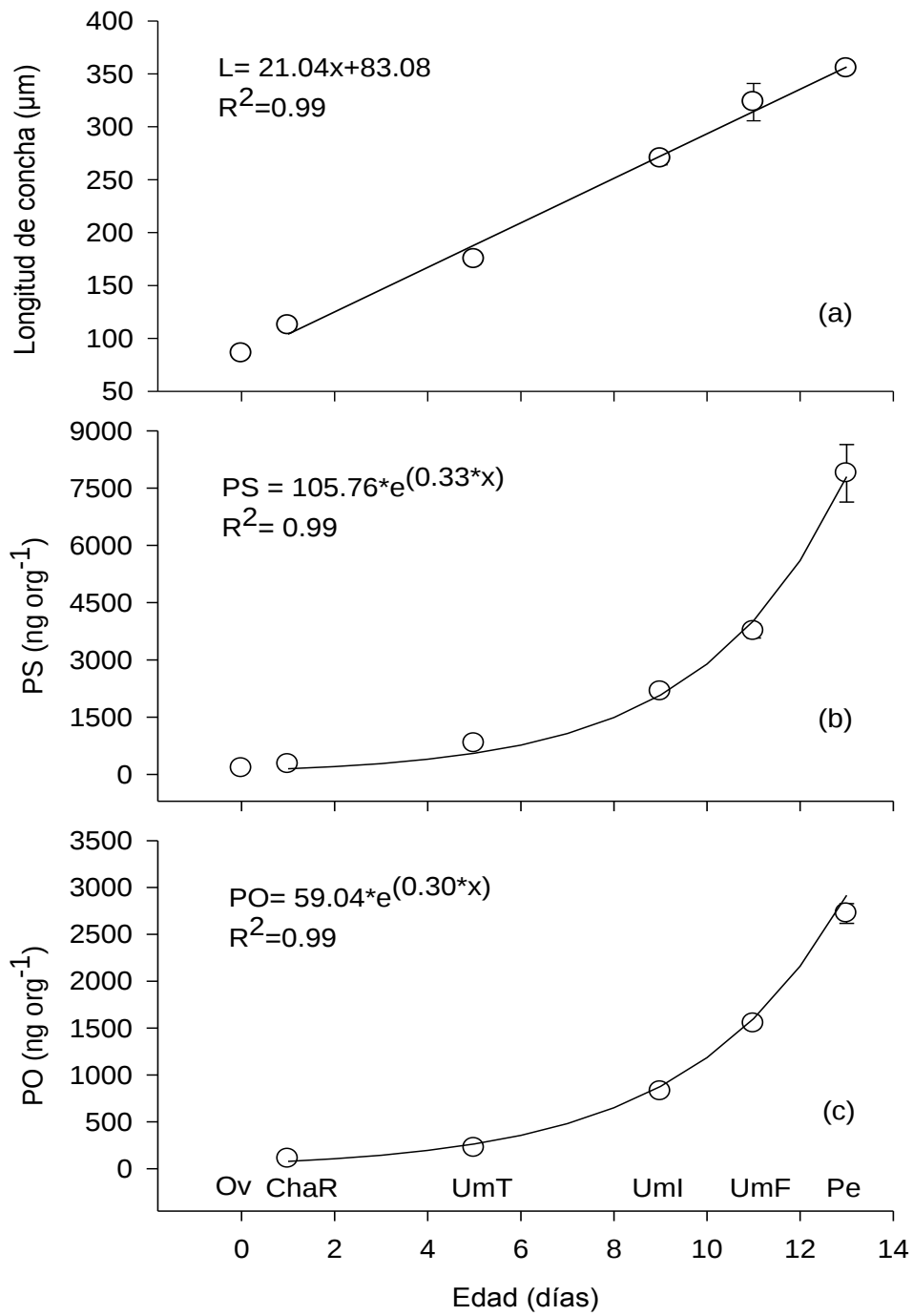


Fig. 2. Cambios temporales en la longitud de la concha (a), peso seco (b), y peso orgánico (c) de *P. globosa*. Se muestran las líneas de ajuste y sus ecuaciones en cada caso, los estadios de desarrollo también se indican: Ovocito (Ov), Charnela recta

(ChaR), umbonada temprana (UmT), Umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

La relación entre el peso (PS, ng org⁻¹), peso orgánico (PO, ng org⁻¹) y la longitud de la concha (L, µm) de las larvas de *P. globosa* fue definida mediante las siguientes ecuaciones de tipo potencial:

$$PS = 0.00062 * L^{2.73}; R^2 = 0.97, F = 111.463, P = 0.002$$

$$PO = 0.00018 * L^{2.78}; R^2 = 0.97, F = 92.957, P = 0.002$$

La relación peso seco (ng org⁻¹) - peso orgánico (ng org⁻¹) mantuvo un patrón lineal significativo, definido por la siguiente regresión:

$$PO = 39.680 + 0.35PS; R^2 = 0.98, F = 1316.931, P < 0.001$$

2. Caracterización histológica

Los ejes de orientación que se tomaron como criterio para describir los tipos de cortes histológicos realizados se indican en las figuras 3 y 4. Los cortes sagitales se realizaron a lo largo del eje antero-posterior, mientras que los transversales fueron en el sentido dorso-ventral atravesando los órganos que cubren ambas valvas. El corte frontal fue perpendicular al transversal (Figs. 3 y 4). Finalmente también se obtuvieron cortes oblicuos los cuales atravesaron ambas valvas paralelamente entre el eje anterior- ventral y el dorsal- posterior y entre los ejes anterior-dorsal y ventral -posterior (Figs. 3 y 4).

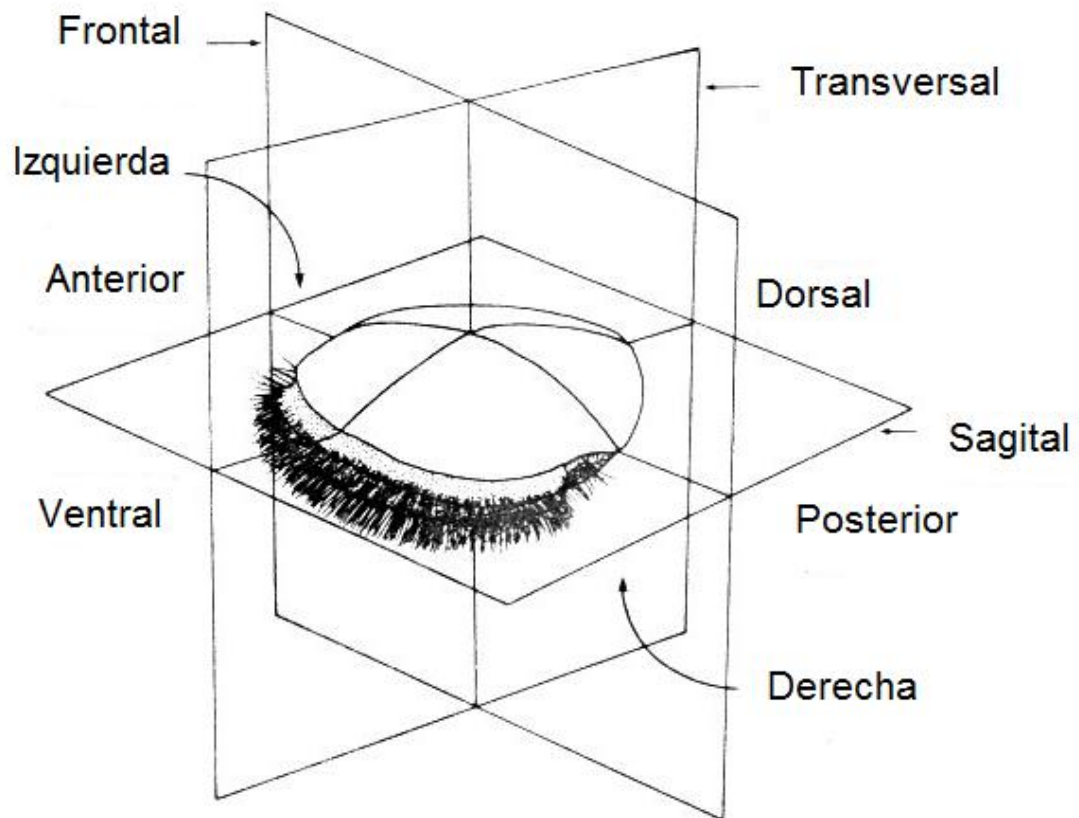


Figura 3. Ilustración de la orientación direccional de la anatomía de una larva de pectínido (modificada de Bower y Meyer 1990).

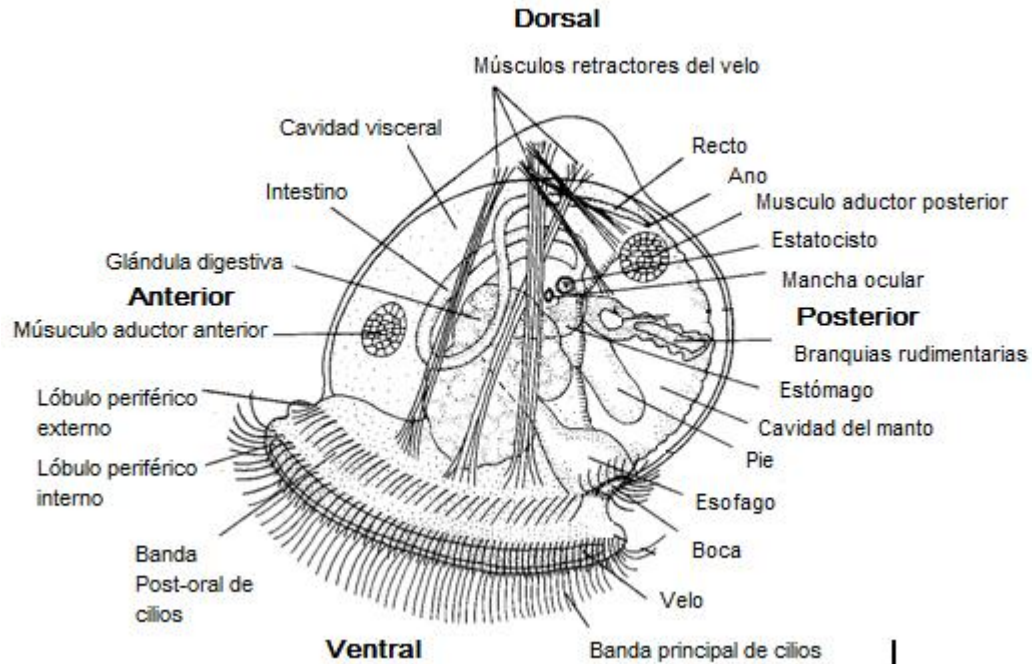


Figura 4. Ilustración interna de la larva veliger (prodissoconcha II) de *Crassostrea virginica* (modificada de Kennedy et al. 1996).

En las muestras de *P. globosa* teñidas con la tinción policrómica se observó el velo de larvas de charnela recta de 1 día de edad (112 μm) a lo largo de la zona ventral (Fig. 5). En este estadio la capa de células germinales del endodermo formaron parte del sistema digestivo el cual se limitó a la boca, esófago y el estómago. La boca se discernió en una hendidura en un costado del velo de la parte posterior, el esófago se localizó en la parte media de la larva en forma de ovalo visto en un corte trasversal y en forma de tubo en un corte sagital (Fig. 5), mientras que el estómago tiene una forma irregular y se encuentra en la parte dorsal (parte superior de la Fig. 5). Otro de los órganos distinguidos en este estadio fue el manto el cual se encuentra conformado por las células germinales del ectodermo (Fig. 5). Varias células germinales se observan dentro la cavidad del manto (Fig. 5).

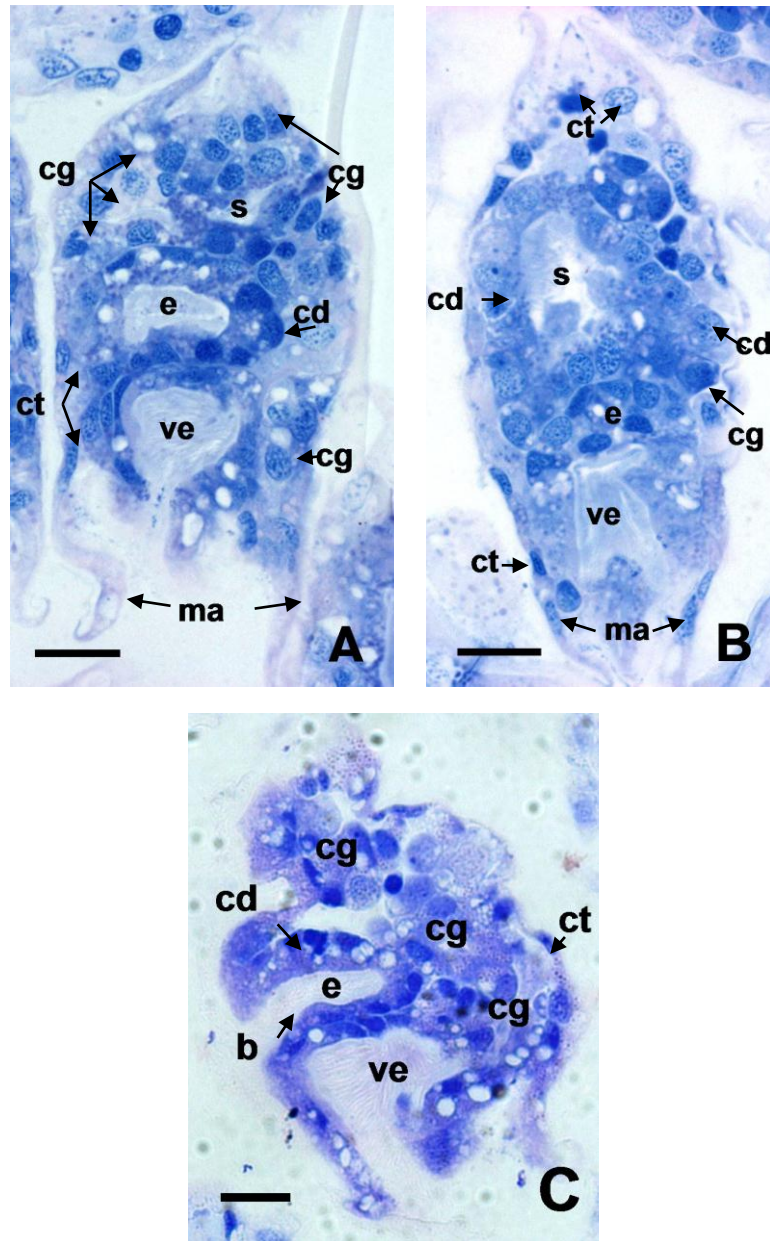


Figura 5. Tinción policrómica de sección trasversal (A y B) y sección sagital (C) de la larva de charnela recta de 112 μm . La parte dorsal de la larva se encuentra orientada en la superficie de las imágenes (A, B y C). La boca (b) estómago (s), esófago (e) y velo (ve) son los órganos distinguidos en este estadio. También se indica el manto (ma), células germinales (cg) capa de células germinales del endodermo (cd) y capa de células del ectodermo (ct). La imagen A muestra bien definido el esófago, la imagen B muestra más claramente el estómago. En la imagen C se observa la boca. La barra equivale 20 μm .

A los 11 días de edad (306 μm) la larva umbonada final presentó un sistema digestivo completo que incluye además de la boca (Fig. 6D), estómago y esófago (Figs. 6A, 6B, 6C y 6D) una glándula digestiva prominente (Fig. 6A, 6B y 6C), intestino (Fig. 5A) y saco del estilete cristalino (Fig. 6D). La glándula digestiva ocupa el mayor espacio de la larva, mientras que el intestino se localiza hacia un costado del estómago. El saco del estilete cristalino se localiza contiguo al estómago (Fig. 6D). El órgano apical es otro de los órganos que se exhibió en este estadio ubicándose en la base del velo (Fig. 6A y 6D). De igual manera esta fase larval mostro desarrollado el pie (Fig. 6B y 6C y 6D) y en la base de éste se distingue la formación de la glándula bisal con apenas una ligera secreción de bisco (Fig. 6C y 6D). El desarrollo incipiente de las branquias también fue evidente en este estadio (Fig. 6B y 6D).

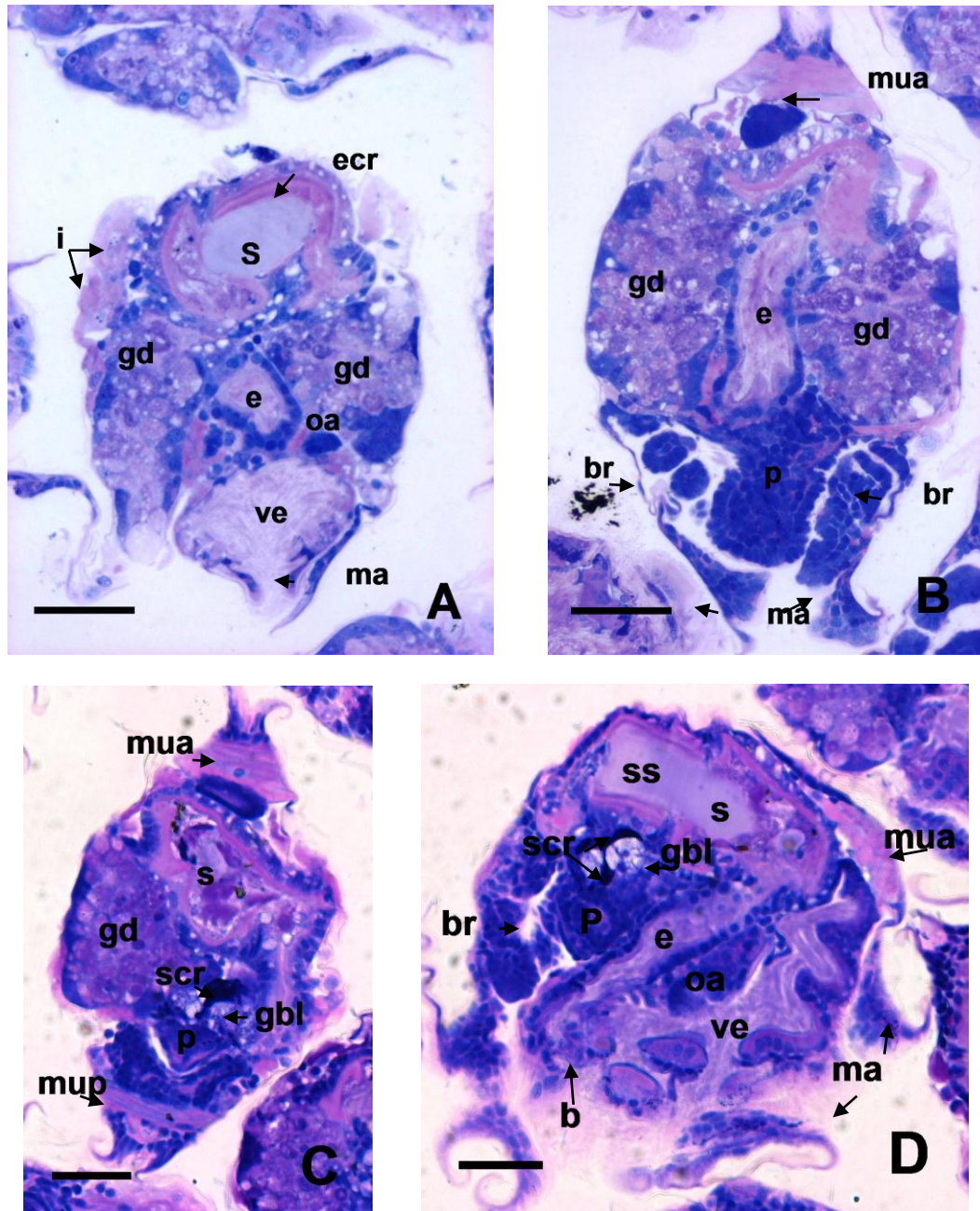


Figura 6. Tinción policrómica de sección transversal (A), frontal (B) transversal oblicua (C), y sagital (D) de la larva umbonada final de 306 μm . En las imágenes A y D la parte dorsal de la larva está orientada en la superficie. En la imagen B y C la zona posterior se encuentra en la parte inferior. En esta fase además del manto (ma), estómago (s), esófago (e) y velo (ve) se observa el órgano apical del velo (oa), boca (b), glándula digestiva (gd), estilete cristalino (ecr), saco del estilete cristalino (ss), desarrollo del pie (p), glándula basal (gbl), secreción de bisco (scr) músculo abductor anterior (mua) y el desarrollo inicial de las branquias (br). La barra equivale 50 μm .

En el estadio pediveliger de 13 días de edad (355 μm) presentó los mismos órganos antes desarrollados, sin embargo se observa una glándula bisal muy desarrollada, así como un aumento de la secreción de bisco generada por la misma (Figs. 7A y 7B). El pie es más largo y también presenta secreciones en toda su longitud (Fig. 7B).

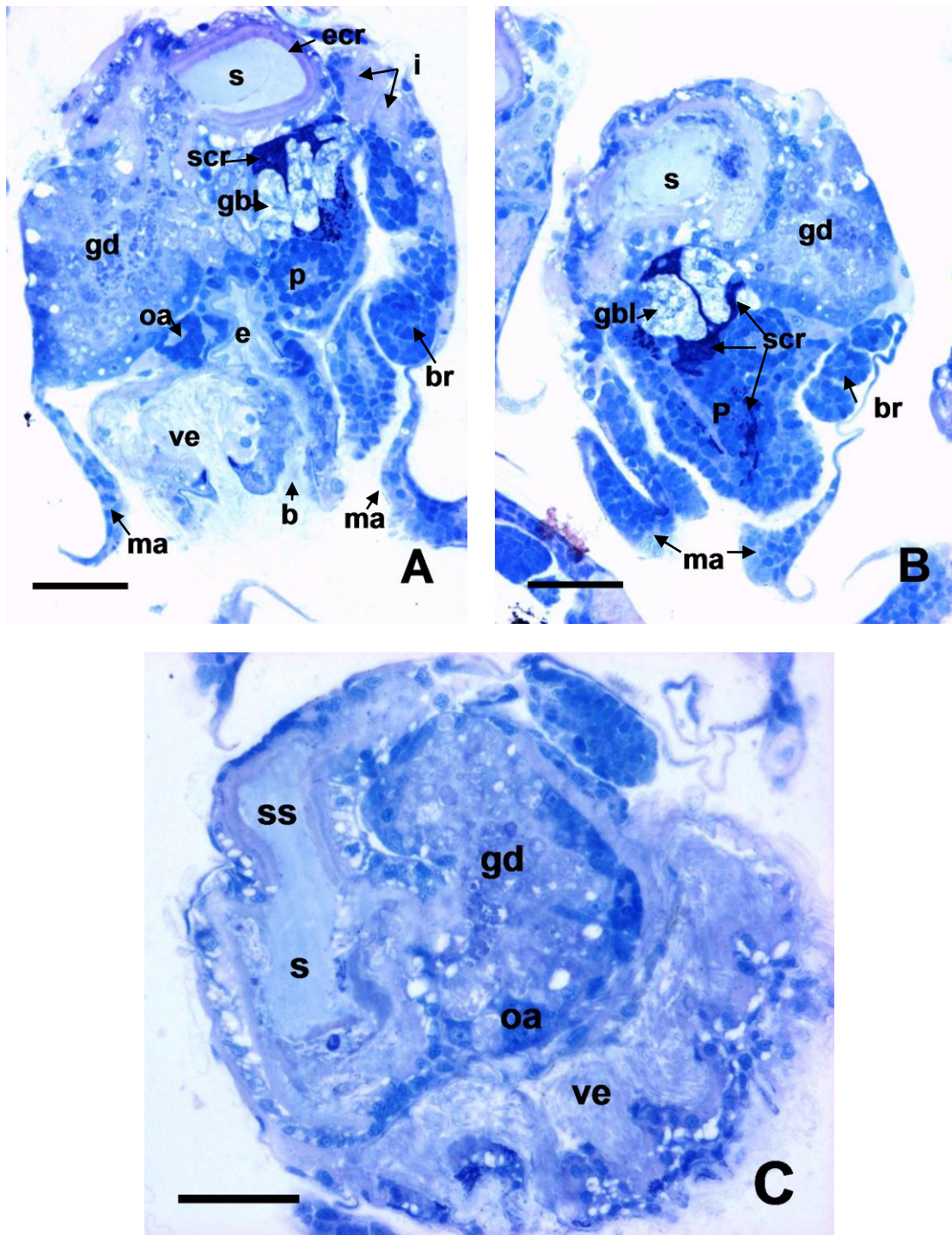


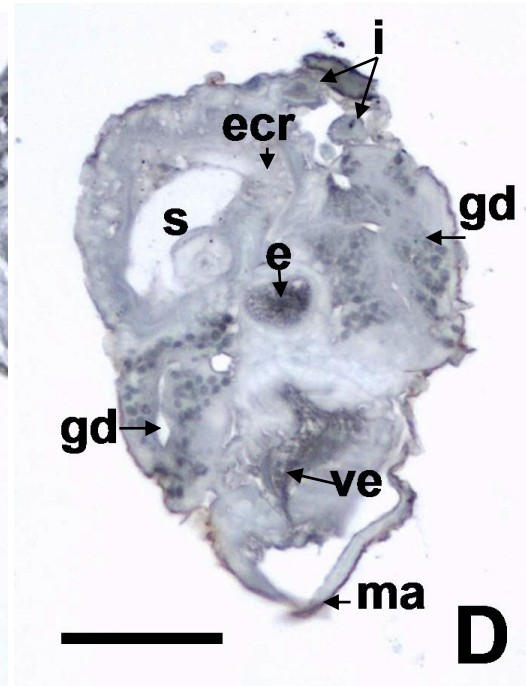
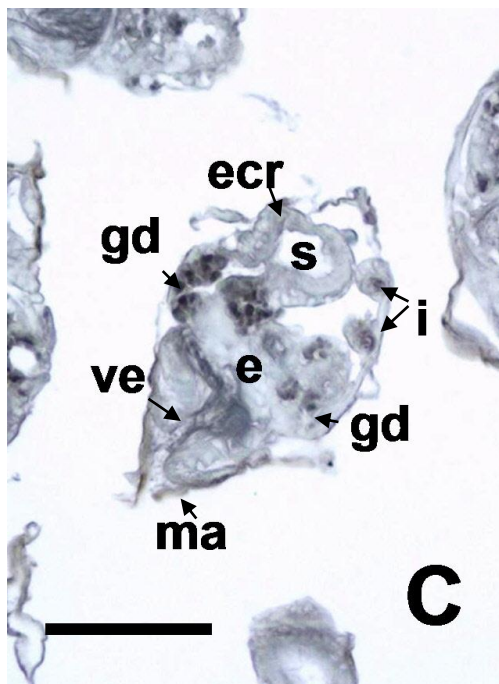
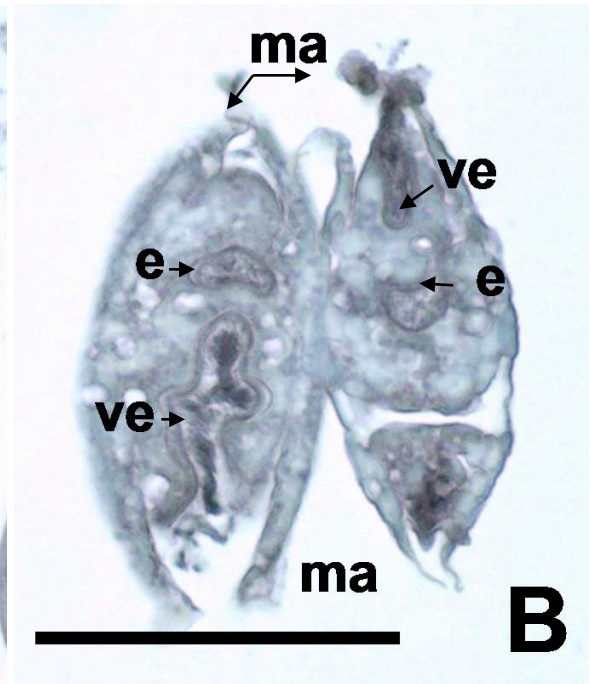
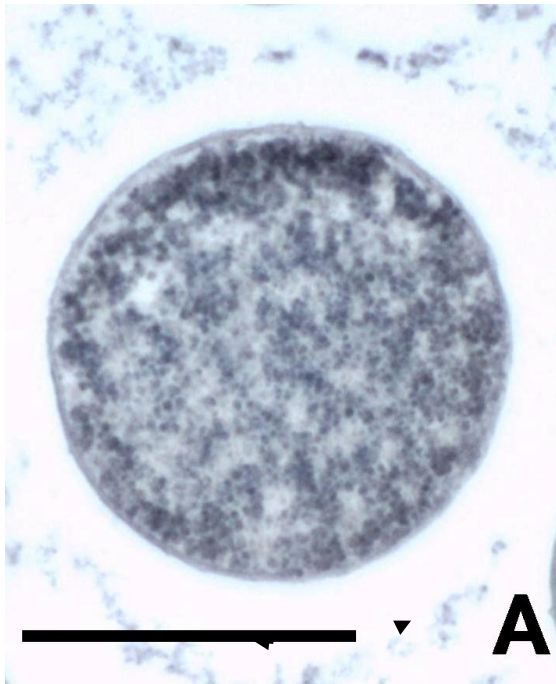
Figura 7. Tinción policrómica de sección transversal (A), oblicua (B) y sagital (C) de la larva pediveliger de 355 µm. La zona dorsal de la larva se localiza en la parte superior de la imagen (A y B), en imagen C la parte dorsal se encuentra en la esquina superior derecha. Se observa el manto (ma), estómago (s), estilete cristalino (ecr), esófago (e), boca (b), velo (ve), órgano apical del velo (oa), desarrollo del pie (p), intestino (i),

glándula bisal (gbl), secreción de bisco (scr) formación de las branquias y saco del estilete cristalino (ss). La barra equivale 100 μm .

Debido a que la muestra colectada no fue suficiente en la fase Uml y UmT no se lograron obtener cortes de estos estadios para los resultados de la tinción policrómica, sin embargo, se puede constatar en los resultados histoquímicos el desarrollo progresivo del sistema digestivo. En la fase UmT se desarrolló la glándula digestiva, el intestino y el estilete cristalino (Figs. 8C y 9C). En la fase Uml continuó el desarrollo de los órganos de la fase anterior (Figs. 8C y 9D).

3. Caracterización histoquímica

Los ovocitos de *P. globosa* presentaron pequeñas gotas de TG de 1.11 ± 0.04 μm de diámetro dispersas en toda el área del corte, (Fig. 8A, Anexo 4, Tabla 1 y 4). Las gotas de TG desaparecieron en la larva de ChaR, pero este constituyente bioquímico se observó disperso en el velo, esófago y parte dorsal de la larva (Fig. 8B). Al alcanzar la etapa UmT las gotas de TG fueron reaparecieron exclusivamente en la glándula digestiva, con un diámetro de 2.12 ± 0.05 μm . El velo y la parte dorsal continuaron con TG presentes en forma dispersa (Fig. 8C, Anexo 4, Tabla 1 y 4). Además en este estadio se comenzaron a evidenciar TG en esófago, intestino y manto (Fig. 8C). La larva Uml presentó TG en los mismos órganos/tejidos que la fase de desarrollo previa. Las gotas de TG presentes en la glándula digestiva alcanzaron 2.85 ± 0.05 μm de diámetro (Fig. 8D, Anexo 4, Tabla 1 y 4). En las dos últimas fases UmF y Pe (Figs. 8E, 8F y 8G) la orilla del estómago y del saco del estilete cristalino presentaron TG (Anexo 4, Tabla 1 y 4).



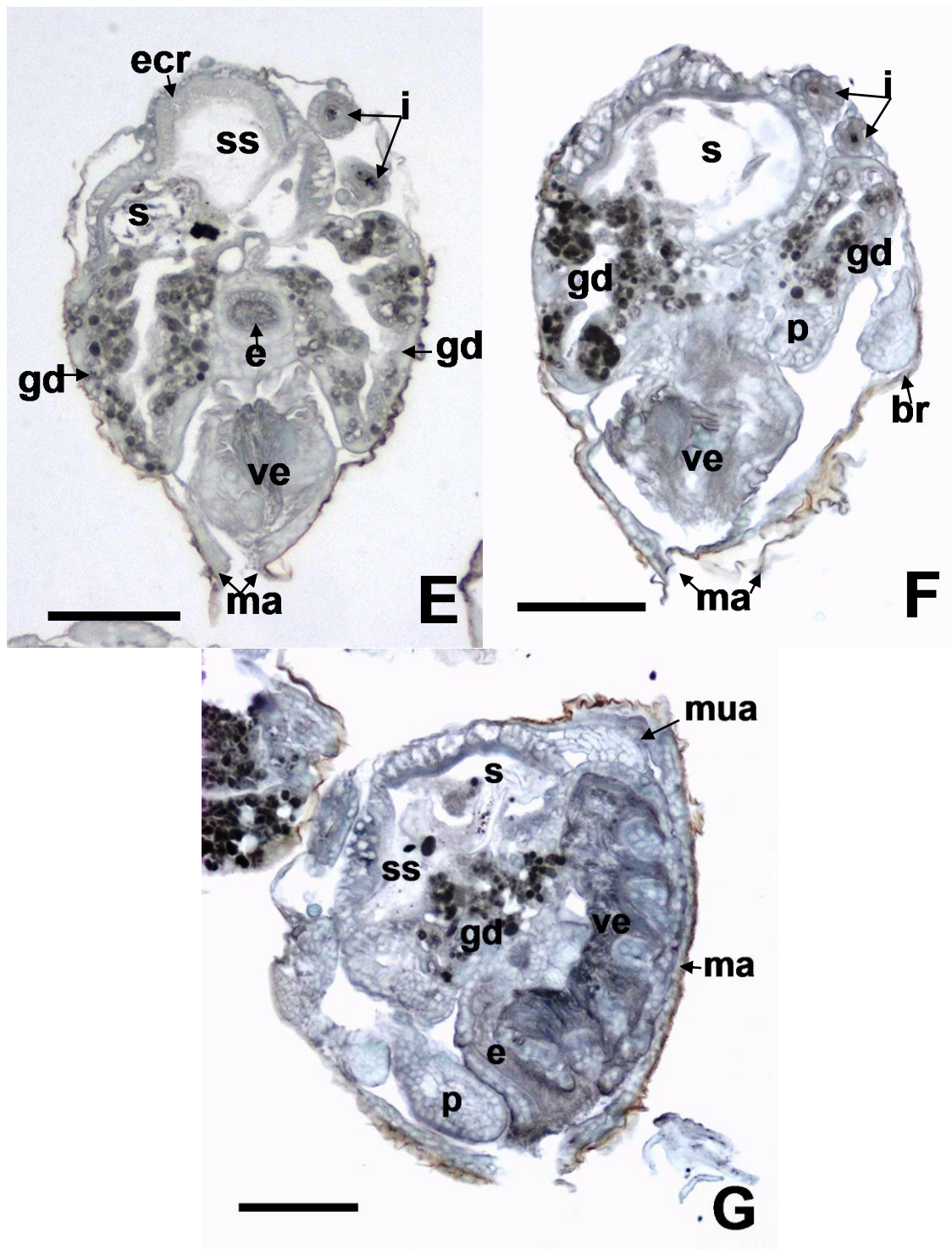
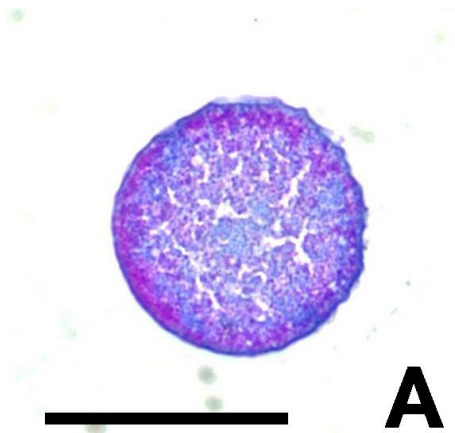


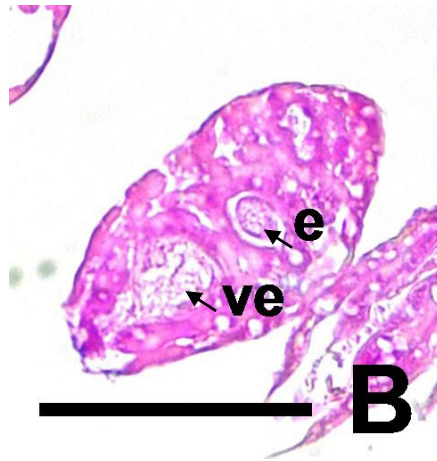
Figura 8. Localización de triglicéridos (TG) en ovocito y etapas larvales de *Panopea globosa*. Ovocito (A), Charnela recta (B), Umbonada temprana (C), Umbonada intermedia (D), umbonada final (E) y pediveliger (F y G). Secciones transversales (A, B, C, D, E y F) y sección sagital (G). Los órganos con TG incluyen el velo (ve), esófago (e), estómago (s), intestino (i) y manto (ma). Órganos identificados que no contienen

triglicéridos: estilete cristalino (ecr), saco del estilete cristalino (ss), branquias (br), pie (p) y músculo abductor anterior (mua). Tinción Sudan Negro, 40X (A y B), 20X (C, D, E, F y G). La barra equivale a 50 μm .

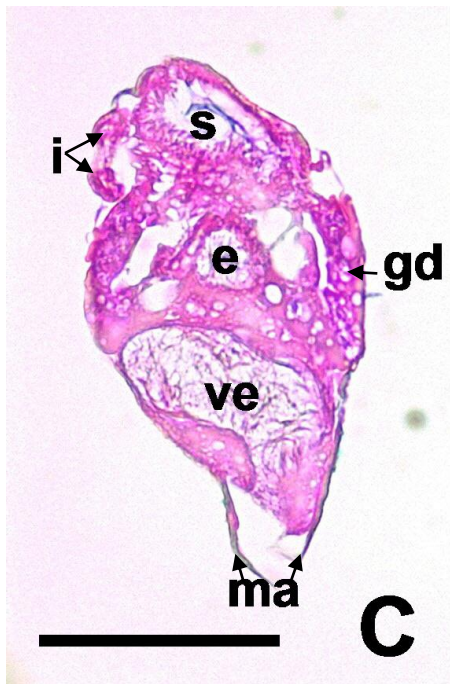
Los carbohidratos (CHOS, azul y purpura) presentes en los ovocitos se observaron como aglomeraciones de puntos presentes en toda el área de cobertura (Fig. 9A). También se observaron CHOS (magenta) en toda el área de corte de la larva ChaR, incluyendo la zona dorsal, esófago, manto y en la base del velo (Fig. 9B). El único sitio donde no se encontraron CHOS fue en el velo (Fig. 9B). En larvas UmT y Uml se observó una disminución general de CHOS, los que se identificaron estaban presentes en el estómago, intestino, pared del esófago, glándula digestiva, manto y en base del velo (Fig. 9C y 9D). En estas fases de desarrollo los CHOS (magenta) comenzaron a acumularse en forma de gotas (al igual que los TG) en la glándula digestiva. El diámetro promedio de estas fue de 2.20 ± 0.41 y 2.64 ± 0.18 μm en UmT y Uml respectivamente (Tabla 1 y Anexo 4). En la fase UmF las gotas de CHOS continuaron presentes en mayor cantidad en la glándula digestiva, aumentando su diámetro a 3.15 ± 0.09 μm (Figs. 9E, 9F, Tabla 1 y 5 y Anexo 4). También se observaron por primera vez CHOS (azul) en la glándula bisal. De igual manera las larvas Pe mostraron CHOS en todos los órganos de los estadios anteriores (azul, magenta y purpura), pero también a lo largo del pie, lumen del estómago y el saco del estilete cristalino estaban llenos de CHOS (azul y purpura), además el tipo de carbohidratos neutros que dominaban en las gotas de la glándula digestiva de las fases anteriores cambió a carbohidratos ácidos (azul) además el diámetro de las mismas finalmente alcanzó un tamaño de 4.12 ± 0.08 μm de diámetro (Fig. 9G, 9H, Tabla 1, 5 y Anexo 4).



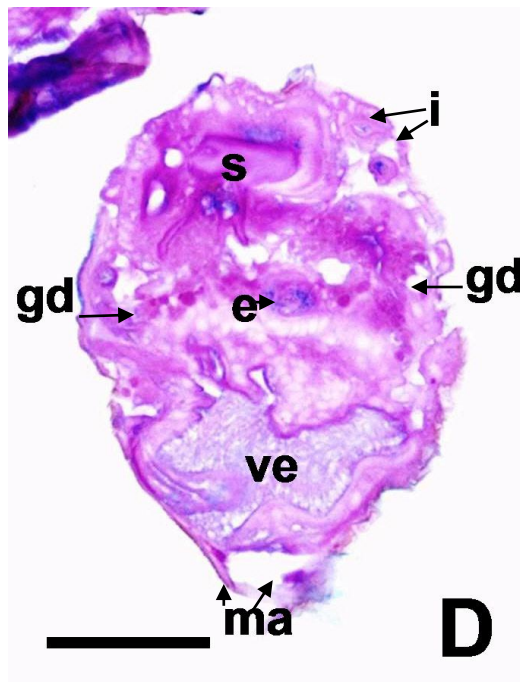
A



B



C



D

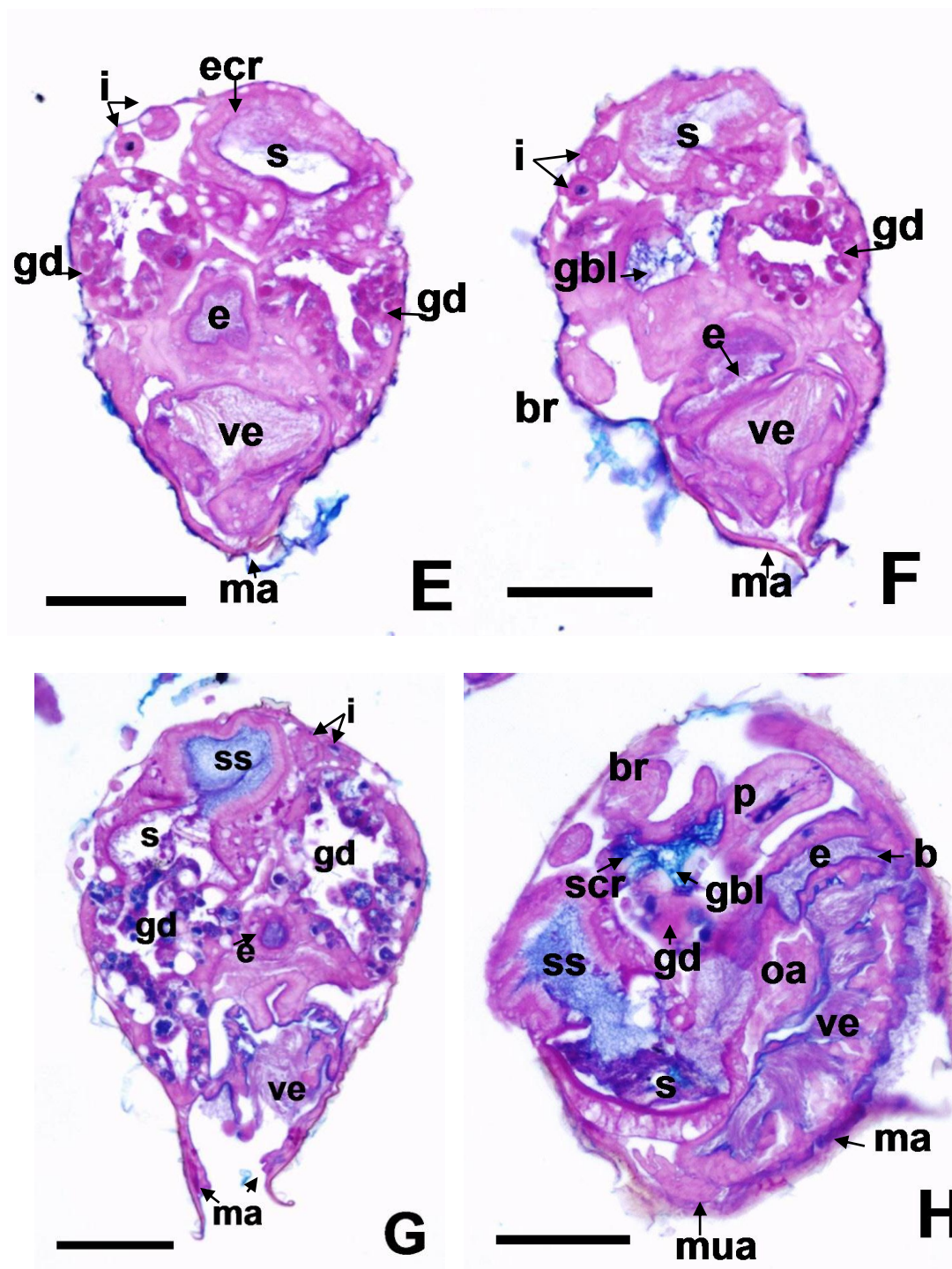


Figura 9. Localización de carbohidratos (CHOS) en ovocito y etapas larvales de *Panopea globosa*. Ovocito (A), Charnela recta (B), Umbonada temprana (C), Umbonada intermedia (D), umbonada final (E y F) y pediveliger (G y H). Secciones transversales (B, C, D, E, F y G) y sección sagital (H). Los órganos/tejidos con CHOS

incluyen la base del velo (ve), esófago (e), estómago (s), intestino (i), pie (P), glándula bisal (gbl), secreciones de la glándula bisal (scr), manto (ma), estilete cristalino (ecr), saco del estilete cristalino (ss) y células indiferenciadas (ci). Otros órganos identificados que no contienen CHOS branquias, glándula bisal (gbl musculo abductor posterior).Tinción Azul Alciano Pas, 40X (A, B y C), 20X (D, E, F, G y H). La barra equivale a 50 μ m.

Tabla 1. Cambios en el diámetro promedio ($\pm$ error estándar) de las gotas de TG y CHOS en el ovocito y en la glándula digestiva de los distintos estadios larvales de *Panopea globosa*. Ovocito (Ov), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).

Estadio	Diámetro	
	TG (μ m)	CHOS (μ m)
Ov	1.11 $\pm$ 0.04	nd
UmT	2.12 $\pm$ 0.05	2.20 $\pm$ 0.41
Uml	2.85 $\pm$ 0.05	2.64 $\pm$ 0.18
UmF	3.53 $\pm$ 0.07	3.15 $\pm$ 0.09
Pe	4.16 $\pm$ 0.12	4.12 $\pm$ 0.08

nd= No se definen gotas.

De acuerdo a la estimación del área de cobertura de cada componente evaluado histoquímicamente, se observó que los CHOS fueron más abundantes que los TG en el ovocito, y en la primera (ChaR) y última (Pe) fase de desarrollo larval. Ambos componentes bioquímicos mantuvieron el mismo patrón general de acumulación, los TG disminuyeron significativamente mientras que los CHOS se mantuvieron relativamente constantes (Fig. 10, Anexo 5 y Tabla 5 y 6). En las fases umbonadas los CHOS disminuyeron significativamente, mientras que los TG comenzaron a acumularse nuevamente. Finalmente, los dos componentes aumentan sus niveles porcentuales a partir del estadio UmF, hasta alcanzar valores máximos en

la fase Pe de 35.11 ± 1.07 % (CHOS) y 27.37 ± 1.07 % (TG), los cuales son similares al ovocito (Fig. 10, Anexo 5, Tabla 5 y 6).

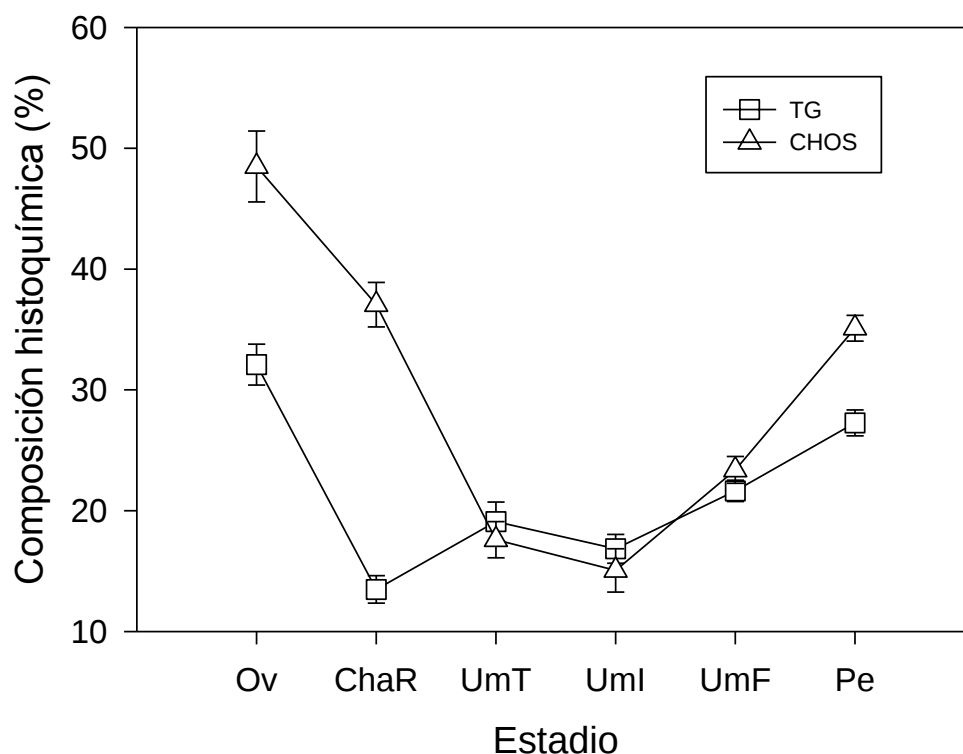


Figura 10. Contenido relativo (%) de triglicéridos (TG) y carbohidratos (CHOS) en ovocitos y larvas de *Panopea globosa* evaluados histoquímicamente. Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (UmI), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).

4. Caracterización bioquímica

El contenido peso-específico de las reservas energéticas ($\mu\text{g mg}^{-1}\text{PS}$) reveló que las proteínas son el componente bioquímico más abundante en las larvas de *P. globosa*, seguido por los lípidos, luego los CHOS y finalmente los TG (Fig. 11; Tablas 8, 9, 10, 11 y Anexo 6). Aunque los CHOS fueron más elevados en la primera (Ov y ChaR) y última fase de desarrollo (Pe) (Fig. 11 y Tabla 9). El contenido de las PT disminuyó

constantemente de Ov a la primera fase umbonada ($173 - 60 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$), luego incrementa linealmente hasta la fase Pe ($151 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$) (Fig. 11 y Tabla 8). Los demás componentes bioquímicos disminuyeron también en las fases primeras de desarrollo (Ov y ChaR), luego se mantuvieron constantes en las fases umbonadas (UmT, Uml y UmF) y se incrementaron al final del periodo larval (Fig. 11; Tabla 9, 10 y 11). Los LT disminuyeron de 153 a $52 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$, luego se mantuvieron constantes de $52 - 60 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ y finalmente alcanzaron $100 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ (Fig. 11 y Tabla 10). Los CHOS obtuvieron valores iniciales de $47 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$, después disminuyeron hasta $11 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ (UmT), posteriormente fueron constantes entre $20-24 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ y al final obtuvieron hasta $45 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ (Fig. 11 y Tabla 9). Los TG tuvieron una reducción de Ov a ChaR de 18 a $5 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$, en fases umbonadas obtuvo valores de 14 a $26 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ y al final alcanzó hasta $31 \mu\text{g mg}^{-1} \text{PS}$ (Fig. 11, Tabla 11 y Anexo 6).

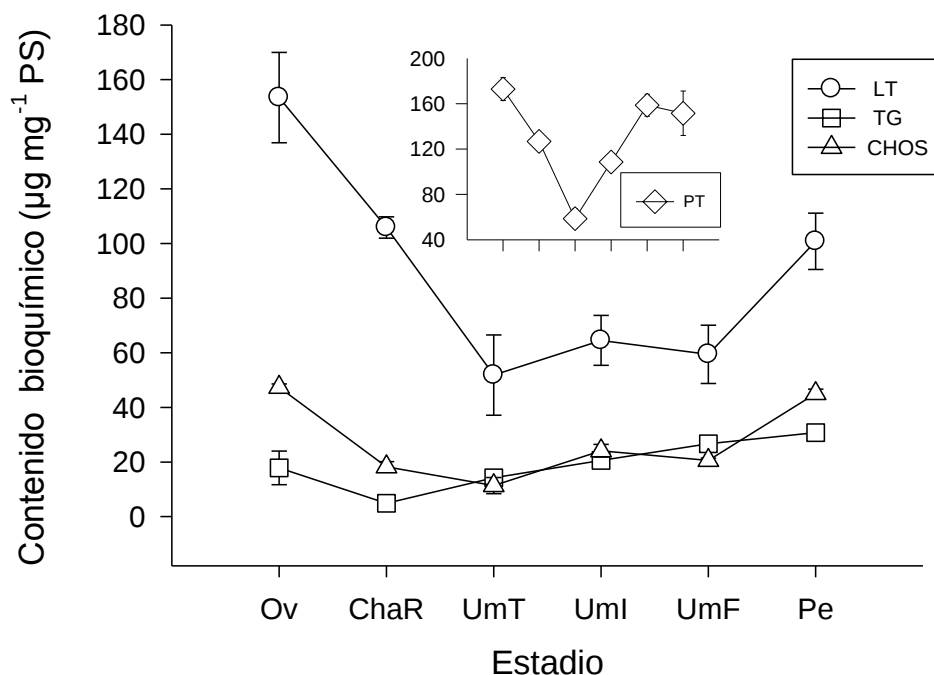


Figura 11. Contenido peso-específico ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PS) de proteínas (PT), lípidos totales (LT), carbohidratos totales (CHOS) y triglicéridos (TG) de distintos estadios larvales de *P. globosa*. Ovocito (Ov), Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).

El contenido peso-específico de las reservas bioquímicas dadas en $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO mostró también que las PT fueron el componente mayoritario (Fig. 12, Anexo 7 y Tabla 12). En este caso se observó que los LT pueden alcanzar los mismos niveles de CHOS en la primera (ChaR) y última fase (UmF y Pe) de desarrollo, solo en las dos primeras fases umbonadas (UmT y Uml) los lípidos fueron más abundantes que los TG y CHOS (Fig. 12, Anexo 7, Tabla 13, 14 y 15). Por otra parte en esta concentración ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO) también se observó que los CHOS son más abundantes que los TG en la fase de ChaR y Pe (Fig. 12, Tabla 13 y 15). El contenido bioquímico en términos de PO reflejó los mismos patrones que se exhibieron en la concentración de PS. Las proteínas de ChaR a UmF disminuyeron de 315 a 215 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO, luego

incrementaron linealmente hasta Pe con un valor de 438 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO (Fig. 12, Tabla 12). Los LT fueron bajos en ChaR (44 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO) posteriormente incrementaron y se mantuvieron constantes con valores de 54-72 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO y al final del periodo larval alcanzaron 127 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO (Fig. 12, Tabla 14). El contenido de CHOS inicialmente (ChaR) fue de 45 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO, luego se mantuvo constante entre 41-64 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO y en fase premetamórfica mostro hasta 130 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO. Los TG de larva de ChaR a fases umbonadas obtuvieron entre 12-64 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO y en fase Pe obtuvo hasta 90 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PO (Fig. 12, Anexo 7, Tabla 15).

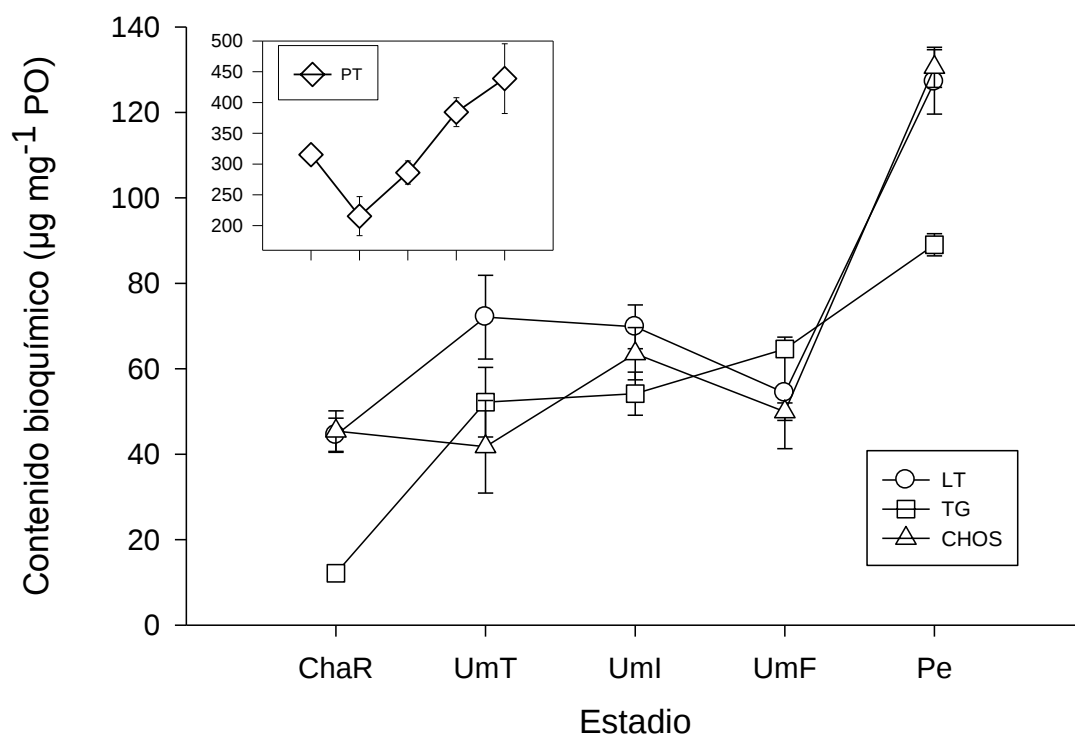


Figura 12. Contenido peso-específico ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO) de proteínas (PT), lípidos totales (LT), carbohidratos totales (CHOS) y triglicéridos (TG) de distintos estadios larvales de *P. globosa*. Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (UmI), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).

Al expresar el contenido bioquímico de las larvas de *P. globosa* por individuo se puede notar un patrón de incremento exponencial (Fig. 13) similar al del peso orgánico, y las diferencias en la cantidad absoluta de cada componente se hicieron más evidentes en el estadio de umbonada final. Así, al final de la etapa larval el contenido total de proteínas fue más alto ($1,250 \pm 194 \text{ ng org}^{-1}$), seguido por los lípidos ($452 \pm 46 \text{ ng org}^{-1}$) y carbohidratos totales ($356 \pm 13 \text{ ng org}^{-1}$). En esta etapa los triglicéridos constituyeron aproximadamente el 50% de los lípidos totales (Fig. 13).

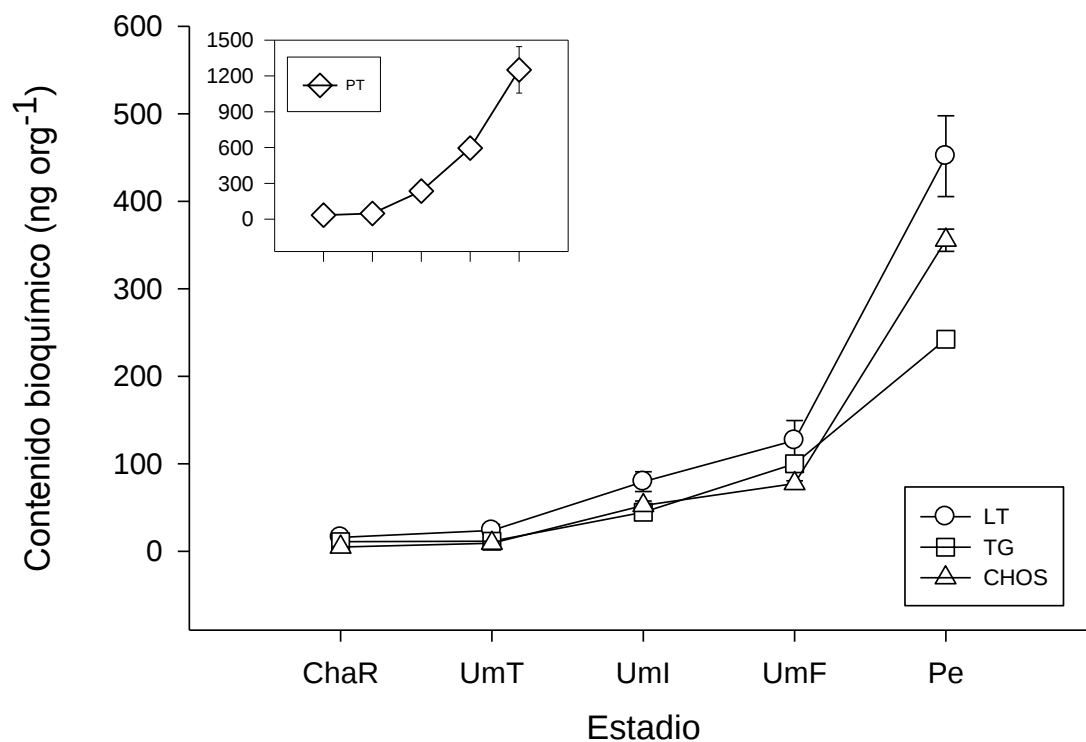


Figura 13. Contenido individual de proteínas (PT), lípidos totales (LT), carbohidratos totales (CHOS) y triglicéridos (TG) de distintos estadios larvales de *P. globosa*. Charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (UmI), umbonada final (UmF) y Pediveliger (Pe).

La correlación entre la longitud de la concha y el diámetro de las gotas de TG formados en la glándula digestiva resulto altamente significativa ($r = 0.968$; $p=0.0067$), mientras que la correlación entre la longitud de concha y el diámetro de las gotas de CHOS fue marginalmente no significativa ($r = 0.942$; $p=0.0575$).

DISCUSIONES

En el presente estudio *P. globosa* manifestó una tasa de crecimiento lineal con un valor similar a lo reportado previamente por Ferreira-Arrieta et al. 2014 (21 $\mu\text{m día}^{-1}$), así como un crecimiento exponencial del tejido. También los estadios de desarrollo reportados previamente aparecieron conforme a lo reportado por Ferreira-Arrieta et al. (2014). Lo anterior indica que la forma de cultivo utilizada en el presente trabajo es altamente replicable y consistente.

Por otra parte, la evaluación histológica permitió observar estructuras internas de las larvas que normalmente no se pueden notar al microscopio en larvas intactas (morfología externa). Así, fue evidente que en la fase de ChaR la larva de *P. globosa* presenta un sistema digestivo rudimentario, pues las capas del endodermo solo están formando la boca, esófago y el estómago. La glándula digestiva y el intestino no fueron evidentes en este estadio, lo cual coincide con Bower y Blackburn (2003) quienes reportaron el mismo grado de desarrollo del sistema digestivo en el estadio de ChaR de *P. generosa*. Esto sugiere que al inicio de la etapa de prodisoconcha I (larva “D”), las larvas de *P. globosa* dependen principalmente de las reservas energéticas que contiene el huevo, y en menor proporción del alimento exógeno. Probablemente sean capaces de ingerir (velo y boca) y digerir parcialmente (estómago) alimento microparticulado pero aun no tienen eficientizados los procesos de digestión y absorción de nutrientes hasta que aparezcan la glándula digestiva y el intestino. Estos órganos ya están formados en las larvas UmT, además del estilete cristalino. Por lo tanto en esta etapa *P. globosa* ya tiene la habilidad de llevar a cabo procesos de digestión y absorción del alimento exógeno.

Las larvas del estadio UmF además del estilete cristalino presentan un saco o envoltura, lo cual sugiere una mayor eficiencia digestiva facilitada por los remolinos mecánicos que ejercen los cilios dentro del saco del estilete cristalino. Externamente este estadio había sido descrito previamente por Ferreira-Arrieta et al. (2014) como umbonada final la cual es un estadio previo a la pediveliger o premetamórfica. Esta es la primera vez que se describe el desarrollo inicial del pie en la fase umbonada, el cual aparece junto con las secreciones de la glándula bisal. Así mismo se observa un desarrollo inicial de las branquias, formación del órgano apical y los dos músculos aductores (anterior y posterior). Al llegar al estadio Pe, la larva ya presenta los mismos órganos anteriores solo que el pie se encuentra más desarrollado y se observa un aumento de las secreciones de la glándula bisal. El hecho de que el estadio UmF presentara branquias rudimentarias, pie y glándula bisal, demuestra que dichos órganos comienzan a desarrollarse internamente antes de que se note la morfología externa descrita para larvas premetamórficas. La etapa pediveliger de *P. globosa* del presente estudio presentó un pie más desarrollado y hubo una producción importante de secreción de bisco en la base y a lo largo del mismo, lo cual sugiere que este ya es un pie funcional, con capacidad para sensor el sustrato (Waller 1981).

Los patrones temporales del contenido lípidos y carbohidratos evaluados cuantitativamente e histoquímicamente en ovocitos y larvas de *P. globosa* fueron muy similares. Ambos componentes bioquímicos disminuyen de la fase de Ov a ChaR. Los TG aumentaron consistentemente en las etapas larvales posteriores mientras que los CHOS se mantuvieron constantes en las fases umbonadas (UmT, UmI y UmF) y aumentaron al final del periodo larval. El hecho de que los patrones cuantitativos evaluados espectrofotométricamente fuesen similares a los semi-cuantitativos

(histoquímica) indican que las evaluaciones histoquímicas no solamente sirven para identificar los órganos de almacenaje de las larvas de *P. globosa*, sino también para cuantificar de manera confiable el contenido relativo de las reservas energéticas.

El patrón de utilización de las reservas energéticas de la fase huevo a larvas veliger tempranas y los patrones de acumulación de estos constituyentes al final del desarrollo larval de *Panopea globosa* difiere con lo reportado en embriones y larvas de escalopos (Farías et al. 1998 y Whyte et al. 1987), ostras (Mann y Gallagher 1985; Gallagher et al. 1986; Labarta et al. 1999; Chaparro et al. 2006) y almejas (Mann y Gallagher 1985, Gallagher et al. 1986) ya que esta es la primera vez que se reporta un aumento tan grande en los niveles de CHOS a lo largo del desarrollo larval. Generalmente los CHOS están en un bajo porcentaje en las larvas de moluscos y se mantienen relativamente constantes durante todo el desarrollo. (Farías et al. 1998 y Whyte et al. 1987; Mann y Gallagher 1985; Gallagher et al. 1986; Labarta et al. 1999; Chaparro et al. 2006). Se ha propuesto que el consumo de las reservas energéticas del huevo está relacionado con utilización de energía para soportar la natación, desarrollo embrionario y la morfogénesis de la etapa trocófora (Utting y Doyou 1992 y Farías et al. 1999). En este estudio se propone que al igual que la larva trocófora, la fase de ChaR de *P. globosa* utiliza las reservas de los ovocitos para desarrollar principalmente los órganos del sistema digestivo. Se sabe que el patrón de acumulación de los constituyentes bioquímicos en la fase premetamórfica tiene relación con el grado de intensidad con el que son utilizados dichos sustratos durante la metamorfosis. En este proceso las larvas de bivalvos consumen escaso o nulo alimento exógeno y además sufren cambios radicales que incluyen la migración del ano y la boca, así como la formación de branquias, pie, ganglio pedal y palpos labiales funcionales (Bayne 1976;

Manahan y Crisp 1982; Baker y Mann 1994). Por lo mismo, durante esta etapa las larvas dependen de las reservas endógenas para ser utilizadas como fuente de energía. El alto consumo de energía durante esta etapa se refleja también en la tasa metabólica, la cual es más alta en larvas metamórficas que en estadios larvales previos o estadios poslarvales inmediatamente posteriores a la metamorfosis (García-Esquivel et al. 2001).

Esta es la primera vez que se realiza una aproximación histoquímica para cuantificar y definir los sitios de almacenaje de las principales reservas energéticas en larvas de género *Panopea* lo cual fue simultáneamente comprobada con análisis cuantitativos tradicionales. Es importante notar que los CHOS se observaron como pequeños puntos aglomerados (azules) dispersos en toda la superficie del ovocito, mientras que los TG aparecieron como pequeñas gotas (1 μm de diámetro). La cantidad de ambos tipos de reserva durante la etapa larval aparentemente estuvo directamente relacionada con el desarrollo del sistema digestivo. En particular, el diámetro de las gotas de TG presentes en la glándula digestiva aumentó significativamente en proporción al tamaño de la larva, desde 2 (UmT) hasta 4 μm (pediveliger), lo cual sugiere que este es el principal órgano de reserva energética de estadios larvales de *P. globosa*. La misma tendencia se observó en el caso de las gotas de carbohidratos, aun cuando el valor de correlación resultó marginalmente no significativo. El velo, el intestino, el esófago y el manto también parecen sitios de almacenamiento y/o movilización de reservas, pero en una escala mucho menor que la glándula digestiva. La evaluación histoquímica en la fase UmF permitió identificar las secreciones de CHOS ácidos producidos por la glándula bisal ubicada en la base del pie, lo cual no es sorprendente ya que las mucinas ácidas son más viscosas que las

neutras (Beninger y Jean 1997). De la misma manera en este estadio se observó la presencia de TG en el estómago, lo que sugiere una alta actividad digestiva de este órgano. En la fase Pe las reservas energéticas se situaron en los órganos antes desarrollados, pero en particular hubo un cambio importante en la coloración de los CHOS, ya que el saco del estilete, el estilete cristalino, el esófago, la base del velo y la glándula digestiva mostraron predominantemente mucinas ácidas (azules), mientras que la pared del estómago exhibió una coloración magenta. Previamente se ha reportado la presencia de mucopolisacáridos ácidos de alta viscosidad en los surcos branquiales de 5 especies de moluscos bivalvos, así como mucopolisacáridos neutros de baja viscosidad en el área de los palpos labiales (Beninger y St-Jean 1997). Se ha sugerido que los mucopolisacáridos ácidos de alta viscosidad encontrados en los surcos de las 5 especies de los bivalvos estudiados tienen una relación directa con la formación de pseudoheces, mientras que los neutros presentes en los palpos labiales tendrían la función de fluidizar el alimento que entra a la boca. La presencia de carbohidratos azules en el estilete cristalino, glándula bisal y pie en la fase Pe de *P. globosa* indica que son mucopolisacáridos ácidos cuya función tendría relación directa con la función de los órganos donde se localizaron (ej.: la viscosidad en el pie es útil en el rastreo/locomoción durante la metamorfosis). Sin embargo en la glándula digestiva la presencia de carbohidratos ácidos sugiere que son almacenados para ser utilizados posteriormente por el pie, o bien son utilizados como fuente de energía durante la metamorfosis. En cualquiera de los dos casos estas hipótesis tendrían que ser avaladas con estudios específicos. Los carbohidratos de color magenta en la pared del estómago es característico de glucógeno (Mowry 1963, Howard 1983), mucinas neutras y glicoproteínas, lo cual también serviría como fuente de energía durante la metamorfosis.

En el presente estudio las proteínas fueron el constituyente principal durante el desarrollo larval de *P. globosa*, lo cual no es sorprendente debido a su función estructural. No obstante, esta es la primera vez que se reporta que los carbohidratos se acumulan en la misma proporción que los triglicéridos en fases umbonadas, y son más altos en la primera (Ov y ChaR) y última fase de desarrollo (Pe). Por lo anterior, se sugiere que los carbohidratos juegan un papel crítico como fuente de energía durante la embriogénesis y la metamorfosis de *P. globosa*. De ser este el caso, sería la primera vez que se reporta el papel crítico de los carbohidratos en el metabolismo energético de larvas metamórficas. En el ostión del Pacífico (*C. gigas*) tanto los lípidos como las proteínas son utilizados como fuente de energía principal durante la metamorfosis (García-Esquivel et al. 2001), mientras que en la ostra europea (*O. edulis*) los lípidos son preferentemente utilizados durante la metamorfosis. Por otra parte en la escalopa *P. yessoensis* tanto los lípidos como las proteínas tienen una contribución significativa en esta última etapa de desarrollo (García-Esquivel 2000). En general se sabe que los niveles de las proteínas son el componente más alto en larvas de bivalvos, seguido por los lípidos y en menor concentración los carbohidratos (Labarta et al.1999; Holland y Spencer 1973; Chaparro et al. 2006; Whyte et al. 1987; Mann y Gallagher 1985; Laing y Utting 1994; Farías et al.1998). Esto debido a que las proteínas son un componente que no solamente tiene función estructural, sino que además aportan una parte importante de la energía necesaria para la metamorfosis. Los triglicéridos representan moléculas netamente utilizadas como fuente de energía, mientras que los carbohidratos tienen el menor contenido calórico, son moléculas típicamente consideradas de uso rápido y generalmente se acumulan en menor cantidad. Los niveles de CHOS ($\mu\text{g mg PS}$) exhibidos por las larvas de ChaR de *P. globosa* son aproximadamente entre 2 a 18 veces más que lo reportado para las larvas veliger

tempranas de las ostras *Ostrea edulis*, y *Ostrea chilensis* y que las almejas, *Teredo navilis* y *B. gouldi* (Labarta et al. 1999; Chaparro et al. 2009; Mann y Gallager 1985) (Tabla 2). Por el contrario, la fase larval temprana del pectínido *Patinipecten yessoensis* (Whyte et al. 1987) esta tiene casi el doble de CHOS que lo que contiene *P. globosa* (Tabla 2). En etapas premetamórficas *P. globosa* presentó entre 2 veces más la cantidad de CHOS que *O. edulis* y *P. yessoensis*, y 40 veces más que las almejas *T. navilis* y *B. gouldi* (Labarta et al. 1999; Chaparro et al. 2009; Mann y Gallager 1985) (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la composición de carbohidratos (CHOS) en estadios tempranos (Vt = veliger temprana, ChaR = charnela recta) y premetamórficos (Pe = pediveliger) de larvas de moluscos bivalvos. Además de la edad, talla y estadio se muestra la temperatura (T) de cultivo.

Especie	Edad	Talla	Estadio	T	CHOS	Autor
	(días)	(μm)		($^{\circ}\text{C}$)	($\mu\text{g mg}^{-1}\text{PS}$)	
<i>P. globosa</i>	1	112	ChaR	22	18.25	Este estudio
	13	355	Pe		45.08	
<i>O. edulis</i>	1	174	ChaR	16	12.00	Labarta et al. 1999
	17	304	Pe		23.30	
<i>O. chilensis</i>	*	250	Vt	17	5.16	Chaparro et al. 2006
	*	450	Pe		3.15	
<i>P. yessoensis</i>		196	Vt	15	26.90	Whyte et al. 1978
	28	260	Pe		23.40	
<i>T. navilis</i>	3	101	Vt	23	7.40	Mann y Gallager 1985
	27	212	Pe		1.03	
<i>B. gouldi</i>	2	63	Vt	23	0.84	Mann y Gallager 1985
	19	161	Pe		0.47	

* = No menciona la edad de la larva.

CONCLUSIONES

1. La tasa de crecimiento larval de *P. globosa* ($21 \mu\text{m d}^{-1}$) fue altamente replicable y comparable al de trabajos previos.
2. Los resultados histoquímicos e histológicos mostraron que el desarrollo de la fase inicial de ChaR de *P. globosa* depende mayormente de las reservas energéticas del huevo, y en menor proporción del alimento exógeno, debido a que el sistema digestivo está incompleto.
3. El pie, glándula bisal, órgano apical, branquias y los dos músculos aductores de *P. globosa* comienzan a desarrollarse en la fase larval UmF, no en la etapa pediveliger. El sistema digestivo ya se encuentra completamente desarrollado en la fase UmF.
4. La glándula digestiva es el principal órgano de almacenaje de reservas energéticas durante el desarrollo larval de *P. globosa*.
5. Los triglicéridos y carbohidratos se acumulan principalmente en forma de gotas en la glándula digestiva de *P. globosa*, y su diámetro aumenta en relación directa con la longitud de la larva.
6. La cantidad relativa de TG y CHOS (histoquímica) coincidió con las evaluaciones cuantitativas, lo que sugiere que la aproximación histoquímica es confiable para identificar los órganos de almacenaje y determinar los patrones temporales en los niveles de reservas de las larvas de *P. globosa*.
7. Esta es la primera vez que se reportan niveles de carbohidratos comparables o mayores que los lípidos durante el desarrollo larval de moluscos bivalvos, lo

que sugiere un papel principal de estas moléculas durante o después de la metamorfosis de *P. globosa*.

REFERENCIAS

- Arcos-Ortega, F. A., S. J. S. Leon–Hing, C. Rodríguez-Jaramillo, M. A. Burgos-Aceves, I. Giffard-Mena y Z. García-Esquivel. 2015. Biochemical and histochemical changes associated with gonad development of the cortez geoduck clam, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico. *J. shellfish res.* 34:1-9.
- Barnes, H. y J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103–118.
- Baker, S. M. y R. Mann. 1994. Feeding ability during settlement and metamorphosis in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) and the effects of hypoxia on post-settlement ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 181:239-253.
- Bayne, B. L. 1973b. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 53: 39-58.
- Bayliss, O. B. y C. W. M. Adams. 1972. Sudan Black: a general stain for lipids Including free cholesterol. *Histochem J.* 4: 505-515.

- Bayne, B. L. 1976. The Biology of mussel larvae. In marine mussels: their Ecology and Physiology, PP.81-120. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beninger, P. G. y S. D. St-Jean.1997.The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. *Mar. Biol.* 129: 389-397.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, R. E., K. L. Jarvis y K. J. Hyland.1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* 180:136-9.
- Bligh, E.G. y J. M. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem Physiol.* 37: 19-30.
- Bower, S. M. y G. R. Meyer. 1990. Atlas of anatomy and histology of larvae and early juvenile stages of the japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences.* 51pp.
- Bower, S. M. y J. Blackbourn. 2003. Geoduck clam (*Panopea abrupta*): Anatomy, Histology, Development, Pathology, Parasites and Symbionts: Developmental Stages of the Geoduck Clam. <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especies/shellfish-coquillages/geopath/develop-eng.html>

Buitimea-Álvarez, M. I. 2011. Efecto de la salinidad y temperatura sobre el desarrollo larval de *Panopea spp.* Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. 31 pp.

Cain, A. J. 1947. A further note on Nile blue. *Quart. J. Micro. Sei Micr.* 88:383.

Chaparro, O. R., L. R. Navarrete, R. J. Thompson. 2006. The physiology of the larva of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* and the utilisation of biochemical energy reserves during development: An extreme case of the brooding habit *J. Sea. Res.* 55: 292– 300.

Dubois, M. K. A., J. K. Gilles, P. A. Hamilton, Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.

Elston, R. A. 1980. Funcional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Proc. Natl. Shellfish. Ass.* 70: 65-93.

Elston, R. A. 1999. Health management, development and histology of seed oysters. Chapter 16. Juvenile oyster disease. pp. 91-92. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 110 pp.

- Farías, A., I. Uriarte, J. C. Castilla. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 166: 37–47.
- Ferreira-Arrieta, A., Z. García-Esquivel, M. A. Gonzales-Gómez y E. Valenzuela-Espinoza. 2014. Growth, survival and feeding rates of the geoduck clam, *Panopea globosa*, during larval development. Aceptado. 26 pp.
- Gabe, M. 1968. *Techniques Histologiques*, Masson et Cie, Paris, France. 1113 pp.
- Galtsoff, P. S. 1964. The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin*. 64: 1-480.
- Garcia-Ezquivel, Z. 2000. Energy metabolism during early postlarval development in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Tesis doctoral. Coastal Oceanography (marine Sciences Research Center). State University of New York at Stony Brook. 199 pp.
- Garcia-Ezquivel, Z. 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263: 77–103.
- Goodwin, L., W. Shaul y C. Budd. 1979. Larval development of the geoduck clam (*PANOPE GENEROSA*, GOULD). *Proc. Natl. Shellfish. Ass.* 69:73-76.

- Gnaiger, E. 1983. Appendix C. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Gnaiger, E., Fostner, H. (Eds.), *Polarographic Oxygen Sensors: Aquatic and Physiological Applications*. Springer, Berlin, pp. 337–345.
- Gribben, P. E. y B. E. Hay. 2003. Larval development of the New Zealand geoduck *Panopea zelandica* (Bivalvia: Hiatellidae). *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 37: 231–239.
- Gustafson, R. G. y R. G. B. Reid. 1988. Larval and post-larval morphogenesis in the gutless protobranch bivalve *Solemya reidi* (Cryptodonta: Solemyidae). *Mar. Biol.* 97:373-387.
- Helm, M.M. y N. Bourne, N. (comp./ed.) 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, 184 pp.
- Holland, D. L. y B. E. Spencer. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 53: 287–298.
- Howard, D. W. y C. S. Smith. 1983. NOAA Technical Memorandum NMFS-F /NEC- 25; Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks. *Oxford Lab., National Marine Fisheries Serv., Oxford, MD 21654*. 102 pp.

- Kennedy V. S., I. E. Newell y A. F. Eble. 1996. The Eastern Oyster: *Crassostrea virginica*. University of Maryland Sea Grant Publications. 734 pp.
- Labarta, U., M. J. Fernandez-Reiriz y A. Pérez-Camacho. 1999. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 218: 225– 242.
- Laing, I. y D. S. Utting. 1994. The physiology and chemistry of diploid and triploid Manila clam (*Tapes philippinarum* Adams & Reeve) larvae and juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 184: 159-169.
- Leavi, I. L. 2010. Histochemical study on the intestine goblet cells in cichlid and poeciliid species (Teleostei). *Tissue and Cell.* 42: 61–64.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193:265-275.
- Lucas, J. S. y P. C. Southgate. 2012. Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants. Garsington Road, Oxford. 633 pp.
- Manahan, D.T. y D. J. Crisp. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of the pelagic larva: amino acid uptake by bivalve veligers. *Am. Zool.* 22: 635-646

- Mann, R. y S. M. Gallager. 1984. Physiology of the wood boring mollusc *Martesia cuneiformis* Say. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)*. 166: 167-177.
- Mann, R. y S. M. Gallager. 1985. Physiological and biochemical energetics of larvae of *Teredo navalis* L. and *Bankia gouldi* (Bartsch) (Bivalvia: Terenidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 85: 211-228.
- Marsh, J. B., y D. B. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7:574-576.
- Millar, R. H. y J. M. Scott. 1967. The larva of the oyster *Ostrea edulis* during starvation. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 47: 475-484.
- Montes-Orozco V. 2014. Efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis sp.* y *Chaetoceros calcitrans* en el desarrollo larval de la almeja *Panopea generosa*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 65 pp.
- Mowry R. W. 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. with revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8x and their combinations with the Periodic Acid-Schiff reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 106: 402.
- Myers, S. P. D. 2009. Special Stain Techniques for the Evaluation of Mucins. Leica Biosystems, Wetzlar, Germany.

<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>

Pernet, F., V. M. Bricelj y S. Cartier. 2006. Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 329: 265– 280.

Palomo, S. T. 1960. HISTOQUÍMICA; HISTORIA Y APLICACIÓN. Aguilar, Madrid. 506 pp.

Roca, P., J. Oliver y A. M. Rodríguez. 2003. BIOQUÍMICA; TÉCNICAS Y MÉTODOS. Helice, Madrid. 348 pp.

Reid, L. y J. R. Clamp. 1978. The biochemical and histochemical nomenclature of mucus. *Brit. Med. Bull.* 34: 5-8.

Roe, J. H. 1955. The determination of sugar in blood and in spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 212: 335-343.

Shaw, B.L. y H.I. Battle. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35: 325-347.

Smith, P. K., R. I. Krohn, T. I. Hermanson, A. K. Mallia, E. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson y D. C. Klenck. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 150:76-85.

Spencer, B. 2008. Molluscan Shellfish Farming. 296 pp.

Tapia- Morales, S. 2011. Efecto del cloranfenicol y la gentamicina sobre el desarrollo larval de la almeja generosa, *Panopea generosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. 43 pp.

Utting, S. D. y J. Doyou. 1992. The increased utilisation of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture*. 103: 17-28.

Videla, J. A., O. R. Chaparro y R. J. Thompson. 1998. Role of biochemical energy reserves in the metamorphosis and early development of the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol.* 132: 635-640.

Waller, T. R. 1981. Functional Morphology and Development of Veliger Larvae of the European Oyster, *Ostrea edulis* Linne. Smithsonian contributions to zoology number 328. 80 pp.

Whyte, J. N. C., N. Bourne y C. A. Hodgson. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in the larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113: 113–124.

Whyte, J. N. C., N. Bourne y N. G. Ginther. 1990. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.* 106:239–244

Whyte, N. J. C., N. Bourne y C. A. Hodgson. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*. 78: 333–347.

ANEXOS

Anexo 1. Métodos histológicos (para describir la anatomía interna)

Técnica de deshidratación

(Dos lavados de cada alcohol cada 15 minutos).

1. Alcohol etílico 70%°
2. Alcohol etílico 80%
3. Alcohol etílico 90%
4. Alcohol etílico 96%
5. Alcohol etílico 100%

Preparación de resina

Tabla 3. Preparación de 100 ml de resina:

Solución de Infiltración	J B-A plus- solución A (Monómero) (ml)	Peróxido de benzoilo- solución B (Catalizador) (g)
(ml)		
100	100	1.25

Infiltración en resina

1. Eliminar alcohol etílico (100%).
2. Agregar 1 ml de resina y dejar reposar 30 min.
3. Eliminar resina anterior y agregar otro ml de resina, dejar reposar 30 min.

4. Extraer resina preexistente y colocar muestra de organismos sobre el soporte de inclusión. Agregar resina y dejar reposar 24 h en refrigeración.

Técnica tinción policrómica

Preparación:

Policrómico I

- Azul de metileno (0.325 gr.)
- Azure II (0.050 gr.)
- Glicerol (25 ml.)
- Metanol (25 ml.)
- Agua destilada (200 ml.)

Policrómico II

- Fuchsin básica (0.5 gr.)
- Agua destilada (250 ml.)

Tinción:

1. Poner laminillas en agua destilada (2 cambios durante 5 min).
2. Policrómico I (2 min.)
3. Lavar con agua destilada (2 cambios durante 5 min).
4. Policrómico II (10 min).
5. Lavar con agua destilada (2 cambios durante 5 min).
6. Secar durante 1 día
7. montar.

Anexo 2. Métodos histoquímicos (para evaluar TG y CHOS)

Técnica de deshidratación

(Dos lavados de cada alcohol cada 15 minutos).

1. Alcohol etílico 70%
2. Alcohol etílico 80%
3. Alcohol etílico 90%
4. Alcohol etílico 96%
5. Alcohol etílico 100%

Aclaración del tejido con xileno

1. Eliminar alcohol etílico (100%).
2. Agregar 0.5 ml de xilol y 0.5 ml de etanol al 100%. Dejar reposar durante un periodo no mayor a 1 hora.
3. Extraer la solución anterior con una pipeta y agregar 1 ml de xilol. Dejar reposar máximo 30 min.

Infiltración con parafina (Paraplast)

1. Eliminar xilol.
2. Agregar parafina I y dejar reposar en estufa a 65 °C durante 1h.
3. Eliminar parafina I y agregar Parafina II. Dejar reposar en estufa a 65 °C durante 1h.
4. Eliminar parafina II y agregar Parafina III. Dejar reposar en estufa a 65 °C durante 1h.
5. Eliminar parafina III.
6. Agregar muestra a soportes e incluir con parafina IV.

7. Enfriar parafina en congelador a -20 °C.

Técnica para desparafinar

1. Xilol I (5 min)
2. Xilol II (5 min)
3. Xilol III (5 min)
4. Alcohol-Xilol (3 min)
5. Alcohol etílico 95% (2 min)
6. Alcohol etílico 75% I (2 min)
7. Alcohol etílico 75% II (2 min)
8. Agua destilada (5 min)
9. Etanol 70% (5min)

Tinción Sudan Negro para triglicéridos

1. Enseguida de haber desparafinado teñir con Sudan Negro 30 minutos.
2. Lavar en etanol al 70% (sumergir y sacar rápidamente).
3. Lavar en agua corriente.
4. Lavar en agua destilada.
5. Montar con gelatina glicerizada.

Resultados de la tinción:

- Triglicéridos= Gris oscuro a negro

Tinción Azul Alciano Pas para carbohidratos

1. Enseguida de haber desparafinado hidratar los cortes con agua destilada (2 cambios durante 5min) y teñir con Azul Alciano (Ph, 2.5) Pas durante 24 minutos.
2. Lavar en agua destilada (2 cambios de agua cada 5 minutos)

3. Pasar los cortes a ácido periódico al 0.5% durante 10 minutos.
4. Lavar en agua corriente durante 5 minutos y enjuagar con agua destilada.
5. Pasar los cortes por el reactivo de Schiff (30 minutos en el refrigerador).
6. Pasar los cortes a la solución sulfurosa haciendo 3 cambios de 2 minutos cada uno. Lavar con agua corriente durante 5 minutos. Enjuagar con agua destilada.
7. Deshidratar:
8. Etanol I al 96% (1min).
9. Etanol II al 96% (1 min).
10. Etanol I 100% (5min)
11. Etanol II 100% (5 min).
12. Aclarar en citrosol:
13. Citrosol I (5min)
14. Citrosol II (5min)
15. Citrosol III (5min).
16. Montar con gelatina glicerizada.

Resultados de la tinción

- Mucopolisacáridos ácidos = azul intenso
- Mucopolisacáridos neutros = magenta intenso
- Combinación de ambos tipos de mucopolisacáridos = púrpura

Anexo 3. Métodos bioquímicos (para evaluar PT, LT, CHOS y TG)

Proteínas totales.

1. Hidratar muestra liofilizada con 1 ml de agua destilada.
2. Tomar 25 µl de homogeneizado en un mini tubo de 1.1 ml y añadir 500 µl de NaOH 0.1 N.
3. Digerir durante 2 horas.
4. Agitar y recuperar 25 µl en una microplaca.
5. Agregar 200 µl de reactivo BCA.
6. Incubar a 60 °C por 15 minutos.
7. Leer a 562 nm

Lípidos totales.

1. Hidratar muestra liofilizada con 1 ml de agua destilada.
2. Tomar 25 µl de homogeneizado en un mini tubo de 1.1 ml y agregar 250 µl de H₂SO₄ concentrado.
3. Agitar y calentar a 90 °C en baño María durante 10 min.
4. Enfriar en baño de hielo.
5. Agitar y poner 40 µl en cada pozo de una microplaca.
6. Agregar 200 µl de reactivo (Vainillina).
7. Incubar durante 40 min.
8. Leer a 540 nm.

Carbohidratos totales.

1. Hidratar muestra liofilizada con 1 ml de agua destilada.
2. Tomar 100 µl de homogeneizado y añadir 100 µl de TCA al 20%.

3. Centrifugar a 3600 rpm durante 10 minutos a temperatura de 5 °C.
4. Recuperar 25 µl de sobrenadante en un minitubo de 1.1 ml.
5. Agregar 250 µl de antrona (0.001 g de antrona en 1ml de H₂SO₄ al 96%).
6. Calentar a 85 °C de 4 a 10 minutos.
7. Enfriar en baño de hielo.
8. Sembrar 200 µl en una microplaca.
9. Leer a 630 nm.

Triglicéridos.

1. Hidratar muestra liofilizada con 1 ml de agua destilada.
2. Tomar 20 µl de homogeneizado en un pozo de una microplaca.
3. agregar 200 µl de solución reactiva.
4. Esperar 20 min.
5. Leer a 540 nm.

Anexo 4. Prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA 1 vía y Tukey para comparar el diámetro de las gotas de triglicéridos y carbohidratos en ovocitos y en glándula digestiva de los estadios larvales de *P. globosa*.

Tabla 4. Prueba de Kruskal-Wallis y Tukey para comparar el diámetro de las gotas de triglicéridos en los ovocitos y en glándula digestiva de estadios larvales de *P. globosa*; ovocito (Ov), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. Kruskal-Wallis						
H = 69.175 , g.l. 4, P = < 0.001						
Comparaciones						
B. múltiples						
Estadios	Ov	UmT	Uml	UmF	Pe	
TG (µg)	1.074 ^a	2.171 ^{ab}	2.836 ^{bc}	3.542 ^{b cd}	4.186 ^d	

Tabla 5. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el diámetro de las gotas de CHOS en glándula digestiva de las larvas de *P. globosa*; umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA					
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P
Estadios	3	15.064	5.021	42.67	<0.001
Residual	33	3.883	0.118		
Total	36	18.947			
B. Comparaciones múltiples					
Estadios	UmT	Uml	UmF	Pe	
CHOS (µm)	2.203 ^{ab}	2.637 ^b	3.147 ^b	4.106 ^c	

Anexo 5. Análisis de Varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el porcentaje de triglicéridos y carbohidratos evaluados histoquímicamente en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*.

Tabla 6. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el porcentaje de TG entre los ovocitos y los estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA						
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P	
Estadios	5	0.375	0.0749	23.857	<0.001	
Residual	74	0.232	0.00314			
Total	79	0.607				
B. Comparaciones múltiples						
Estadios	Ov	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
TG (%)	0.328 ^a	0.135 ^b	0.192 ^{cd}	0.169 ^{cd}	0.218 ^{b^{cd}}	0.276 ^{ad}

Tabla 7. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar el porcentaje de CHOS evaluados histoquímicamente en los ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. Kruskal-Wallis						
H= 102.44, g. l. 5, P= <0.001						
B. Comparaciones múltiples						
Estadios	Ov	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
CHOS (%)	0.489 ^a	0.374 ^a	0.180 ^b	0.133 ^b	0.229 ^b	0.344 ^a

Anexo 6. Análisis de Varianza de 1 vía, prueba de Tukey y Kruskal-Wallis para comparar la composición bioquímica ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PS) en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*.

Tabla 8. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de PT en los ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA						
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P	
Estadios	5	20716.98	4143.40	11.509	<0.001	
Residual	11	3959.98	360.00			
Total	16	24676.96				
B. Comparaciones múltiples						
Estadios	Ov	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
PT (µg mq ⁻¹ PS)	172.87 ^a	126.67 ^{ab}	58.66 ^{bc}	108.59 ^b	158.59 ^{ab}	151.52 ^{ab}

Tabla 9. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de CHOS en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA						
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P	
Estadios	5	3319.02	663.80	58.69	<0.001	
Residual	12	135.73	11.31			
Total	17	3454.75				
B. Comparaciones múltiples						
Estadios	Ov	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
CHOS (µg mg ⁻¹ PS)	47.34 ^a	18.25 ^{bc}	11.37 ^c	24.11 ^b	20.61 ^b	45.07 ^a

Tabla 10. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de LT en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA						
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P	
Estadios	5	22290.75	4458.15	11.02	<0.001	
Residual	12	4853.37	404.45			
Total	17	27144.12				
B. Comparaciones múltiples						
Estadios	Ov	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
LT (µg mg ⁻¹ PS)	153.44 ^a	105.84 ^{ab}	51.82 ^b	64.52 ^b	59.43 ^b	100.79 ^{ab}

Tabla 11. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Kruskal-Wallis para comparar la composición de TG en ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*; Ovocito (Ov), charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. Kruskal-Wallis						
H= 13.491, g. l. 5, P= 0.019						
B. Comparaciones múltiples						
Estadios	Ov	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
TG ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PS)	17.85 ^a	4.87 ^{ac}	14.21 ^{ab}	20.56 ^{ab}	26.66 ^{ab}	30.74 ^b

Anexo 7. Análisis de Varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición bioquímica ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO) en los ovocitos y estadios larvales de *P. globosa*.

Tabla 12. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de PT entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA					
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P
Estadios	4	76676.571	19169.143	6.409	0.01
Residual	9	26920.033	2991.115		
Total	13	103596.604			
Comparaciones múltiples					
B. Estadios	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
PT ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO)	315.102 ^{abc}	215.282 ^c	286.077 ^{bc}	384.368 ^{ab}	438.835 ^a

Tabla 13. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de CHOS entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA					
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P
Estadios	4	16323.298	4080.824	33.463	<0.001
Residual	10	1219.488	121.949		
Total	14	17542.786			
Comparaciones múltiples					
B. Estadios	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
CHOS ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO)	45.410 ^{ab}	41.757 ^a	63.529 ^a	49.955 ^a	130.546 ^b

Tabla 14. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de LT entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA					
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P
Estadios	4	12309.165	3077.291	14.019	<0.001
Residual	10	2195.158	219.516		
Total	14	14504.324			
B. Comparaciones múltiples					
Estadios	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
LT ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO)	44.456 ^a	72.093 ^a	69.828 ^a	54.355 ^a	127.143 ^b

Tabla 15. Análisis de varianza de 1 vía y prueba de Tukey para comparar la composición de TG entre estadios larvales de *P. globosa*; charnela recta (ChaR), umbonada temprana (UmT), umbonada intermedia (Uml), umbonada final (UmF) y pediveliger (Pe).

A. ANOVA 1 VIA					
Fuente de variación	gl	SS	MS	F	P
Estadios	4	9285.926	2321.481	38.685	<0.001
Residual	10	600.095	60.009		
Total	14	9886.021			
B. Comparaciones múltiples					
Estadios	ChaR	UmT	Uml	UmF	Pe
TG ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PO)	12.129 ^a	52.177 ^b	54.177 ^b	64.632 ^b	89.024 ^c