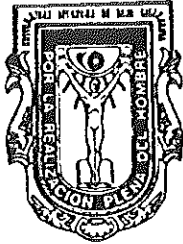


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



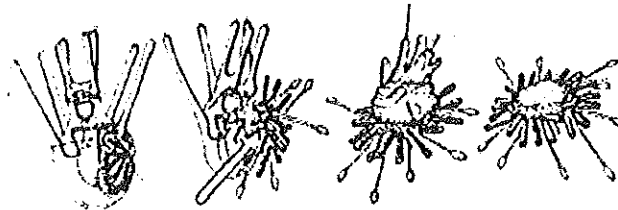
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

OCEANOLÓGICAS

KCL, GABA Y L-GLUTAMINA COMO INDUCTORES A
LA METAMORFOSIS EN LARVAS DE ERIZO ROJO

Strongylocentrotus franciscanus



TESIS

que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera
Presenta



RITA MARCELA PRECIADO PINEDO

Ensenada, B.C., junio de 2000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

KCL, GABA Y L-GLUTAMINA COMO INDUCTORES A LA
METAMORFOSIS EN LARVAS DE ERIZO ROJO

Strongylocentrotus franciscanus

TESIS

que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera

Presenta

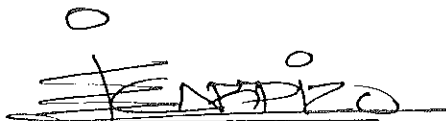
RITA MARCELA PRECIADO PINEDO

Aprobada por:



M. C. Alfredo Palásti Garza

Director



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
Sinodal



Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal

Ensenada, B.C., junio de 2000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

KCL, GABA Y L-GLUTAMINA COMO INDUCTORES A LA
METAMORFOSIS EN LARVAS DE ERIZO ROJO

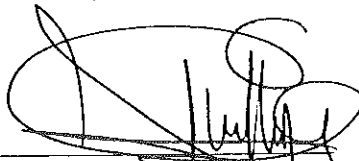
Strongylocentrotus franciscanus

TESIS

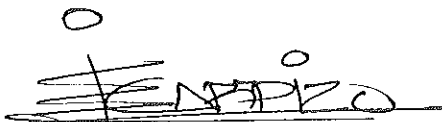
que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera
Presenta

RITA MARCELA PRECIADO PINEDO


Aprobada por:



M. C. Alfredo Palást Garza
Director



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
Sinodal



Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal

Ensenada, B.C., junio de 2000

AGRADECIMIENTO

Al M. en C. Alfredo Salas Garza que fue mi director, mi amigo y muchas veces mi consejero.

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte y al Dr. Zaúl García Esquivel, por sus sabios consejos y observaciones para el enriquecimiento de esta tesis.

De manera general agradezco a todas mis amistades, que siempre han apoyado mis desiciones, me han hecho ver mis defectos y me han ayudado a superarlos.

A mis padres PEDRO Y RITA
Porque esta tesis es el resultado del
esfuerzo y apoyo que en todo momento
me han brindado

A mis hermanos
PEDRO, PABLO Y ALEJANDRO
Porque siempre he recibido de ustedes
cariño y ánimo

A mi esposo GASPAR
Por el amor, comprensión, compañía y
ayuda que ha sido tan importante
para cumplir mis metas

A mi querida hija AIMÉ
que ha sido mi motivo de lucha
y superación

ÍNDICE

	Página
1- INTRODUCCIÓN	1
2- ANTECEDENTES	3
3- OBJETIVO	7
4- METODOLOGÍA	8
4.1 Obtención de larvas competentes	8
4.2. Diseño experimental	9
4.2.1 Inducción a la metamorfosis	9
4.3 Evaluación de los experimentos	11
4.3.1 Metamorfosis	11
4.3.2 Desarrollo de la mandíbula	13
4.3.3 Sobrevivencia de juveniles	15
4.4 Diseño experimental	15
4.5 Análisis estadístico	16
5- RESULTADOS	17
5.1 Primer experimento	17
5.2 Segundo experimento	21
5.3 Sobrevivencia de juveniles	23
5.4 Desarrollo de las mandíbulas	26
6- DISCUSIÓN	28
6.1 Metamorfosis	28
6.2 Sobrevivencia de juveniles	34
6.3 Desarrollo de las mandíbulas	36
7- CONCLUSIONES	39
8- LITERATURA CITADA	40

	Página
9- ANEXO	48
Tabla I. – ANDEVA de dos vías del experimento de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo rojo con diferentes inductores (KCl, GABA, L-glutamina) a diferentes concentraciones (10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-10} M). ($\alpha = 0.05$)	49
Tabla II.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo rojo con diferentes inductores (KCl, GABA, L-glutamina) a diferentes concentraciones (10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-10} M). ($\alpha = 0.05$)	49
Tabla III. – ANDEVA de una vía de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con KCl (concentraciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} M) y el control positivo y negativo, 24 horas pos-inducción. ($\alpha = 0.05$).	50
Tabla IV. – ANDEVA de una vía de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con GABA (concentraciones 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-10} M) y el control positivo y negativo, 24 horas pos-inducción. ($\alpha = 0.05$).	50
Tabla V.- ANDEVA de una vía de la sobrevivencia de las poslarvas después de haber inducido a la metamorfosis con KCl a diferentes concentraciones. ($\alpha = 0.05$).	50
Tabla VI.- ANDEVA de una vía de la sobrevivencia de las poslarvas después de haber inducido a la metamorfosis con GABA a diferentes concentraciones. ($\alpha = 0.05$).	51
Tabla VII.- ANDEVA de los tratamientos de KCl y GABA 10^{-5} M contra los tratamientos de KCl y GABA 10^{-5} M que no fueron expuestos al manejo ($\alpha = 0.05$).	51

Lista de Figuras

- Fig. 1 Diagrama de flujo que muestra de manera esquemática la metodología utilizada para la realización de los experimentos. 10
- Fig. 2. Diseño experimental. Inducción a la metamorfosis de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* con diferentes inductores. 12
- Fig. 3. Diferentes estadios del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. 14
- Fig.4. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 24 y 72 horas después de la inducción con KCl y GABA a diferentes concentraciones 10^{-1} , 10^{-5} y 10^{-10} M. 19
- Fig.5. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 24 y 72 horas después de la inducción con L-glutamina a diferentes concentraciones 10^{-1} , 10^{-5} y 10^{-10} M. 20
- Fig.6. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 24 y 72 horas después de la inducción con KCl (10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} M) y GABA (10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-10} M) a diferentes concentraciones. 22
- Fig.7. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 3, 24 y 72 horas después de la inducción con KCl y GABA a concentración de 10^{-1} M. 24
- Fig.8. Porcentaje de sobrevivencia obtenida de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 10, 17 y 27 días después de la inducción a la metamorfosis con KCl y GABA a diferentes concentraciones. 25
- Fig. 9. Porcentaje de juveniles de *Strongylocentrotus. franciscanus* que presentaron mandíbula funcional, en relación al 100% de los sobrevivientes. Los muestreos se realizaron a los 17 y 27 días después de la inducción a la metamorfosis con KCl y GABA a diferentes concentraciones. 27

RESUMEN

Se utilizaron los inductores químicos KCl, GABA y L-glutamina en la inducción a la metamorfosis de la larva del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, utilizando diferentes concentraciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-10} M) y tiempos de exposición (3 y 24 horas). Se analizó el porcentaje de metamorfosis obtenido con cada uno de los tratamientos y el efecto en la sobrevivencia de juveniles y en la presencia de una mandíbula funcional. Se obtuvo que el porcentaje de metamorfosis tuvo una relación directa con la concentración del inductor, mas no con la sobrevivencia de los organismos. La exposición al KCl, GABA y L-glutamina a concentración 10^{-1} M con exposición de 24 horas resultó ser tóxica para la larva.

1- INTRODUCCIÓN

En la costa Pacífico del estado de Baja California existen cuatro especies de erizo: *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus*, *Centrostephanus coranatus* y *Lytechinus albus*. De estas especies, se explotan comercialmente desde 1972 el erizo rojo *S. franciscanus* y desde 1993 el erizo morado *S. purpuratus*, por poseer un alto rendimiento y calidad de sus gónadas que satisfacen los requerimientos en el mercado internacional (Palleiro-Nayar, *et al.*, 1994).

El erizo rojo es un equinodermo bentónico característico de aguas templadas. Se distribuye desde Alaska (Estados Unidos) hasta Isla Cedros (Baja California, México) encontrándose también en las costas de Japón (Ricketts y Calvin, 1968; Allen, 1980). Se localiza desde la zona intermareal hasta los 30 metros de profundidad, aunque se ha reportado a profundidades de hasta 120 metros (Mottet, 1976). Habita en sustratos rocosos, en áreas de alto y bajo relieve, así como en las grietas de las rocas. Se encuentra asociado a los mantos de algas pardas como *Macrocystis pyrifera*, por ser esta alga su alimento primordial (Palleiro-Nayar *et al.*, 1988). Presenta sexo separado sin dimorfismo. La fecundación es externa y da lugar a una larva planctónica luego de sucesivos estadios de desarrollo. Una vez que alcanza el estadio competente, la larva se metamorfiza, lo que determina su incorporación a la vida bentónica (Bustos *et al.*, 1991).

El erizo rojo es importante comercialmente por el delicado sabor de sus gónadas, que son muy apreciadas en oriente ya que se consideran comparables con el caviar (Brandon y Rockop, 1985). Japón, en busca de satisfacer la demanda en su país y proteger su recurso de la sobreexplotación, ha tenido que recurrir a la importación de la gónada de erizo de otros países

como Canadá, Estados Unidos y México (Malagrino-Lumare, 1972; Farías-Sánchez, 1980).

A pesar de que en el estado de Baja California existen medidas de regulación tales como la talla mínima de extracción y periodo de veda reproductiva, la mayoría de los bancos de erizo se encuentran en niveles altos de explotación o están sobrexplotados (Arredondo-Gómez, 1994), lo que ha causado una disminución en las poblaciones naturales. Lo anterior afecta notablemente al reclutamiento de juveniles al dejarlos sin la protección que les brindan las espinas de los adultos y reduciendo al mismo tiempo el potencial reproductivo (Tegner y Dayton, 1977).

Con base en lo expuesto anteriormente, una alternativa para mantener y/o incrementar las poblaciones que sustentan esta pesquería, es el desarrollo de actividades de cultivo y repoblación. Esto ha llevado a realizar estudios sobre la biología y pesquería del erizo en aspectos importantes como crecimiento, alimentación, reproducción, técnicas de captura, opciones de manejo y repoblación (Arredondo-Gómez, 1994; Tegner, 1989; Pfister y Bradbury, 1996).

La finalidad de la presente investigación es evaluar diferentes inductores a la metamorfosis del erizo rojo *S. franciscanus*, para contribuir en el desarrollo de la biotecnología de producción de juveniles en condiciones de laboratorio.

2- ANTECEDENTES

El crecimiento del erizo rojo es relativamente lento, para alcanzar la madurez sexual necesita de uno a dos años después del asentamiento (Kato y Schroeter, 1985). Durante su ciclo de vida presenta dos etapas: la etapa larvaria, la cual se caracteriza por su vida pelágica y su simetría bilateral; y la etapa que comprende del juvenil al adulto, con características totalmente diferentes como lo son simetría radial y una vida bentónica (Chia y Burke, 1977). Al final del periodo larvario se dan dos procesos importantes: el asentamiento descrito como un proceso reversible y exploratorio; este comportamiento es una característica de las larvas de diversos invertebrados cuando están en búsqueda del sustrato adecuado. El segundo proceso es la metamorfosis, definida como una cadena de eventos irreversibles, que comienzan con la recepción de un estímulo usualmente asociados a un sustrato favorable y continúa con una serie de cambios fisiológicos y morfológicos (Scheltema, 1974).

Para que se inicie la metamorfosis, las larvas requieren la detección de señales biológicas y/o químicas específicas, asociadas con sustratos colonizados o potencialmente colonizables (Segovia-Mattos, 1994). A lo largo de los años se ha demostrado que existen varios tipos de disparadores que sirven como inductores exógenos de la metamorfosis. Debido al reducido tamaño en los estadios larvales ha resultado muy complejo comprender en la mayoría de los grupos estudiados, cuales son los factores o mecanismos que regulan la metamorfosis, tanto a nivel ambiental como endócrino (Carpizo-Ituarte, 1994). También se sabe que la respuesta al asentamiento en muchas larvas de invertebrados marinos está controlada por un número de factores intrínsecos y extrínsecos (Doyle, 1974), como el hereditario, la edad de la larva

(Hadfield, 1977), el historial de nutrición (Kempf y Willows, 1977, Perron y Turner, 1977), y características físico-químicas del sustrato (Williams, 1969).

En diferentes investigaciones relacionadas con la metamorfosis en invertebrados, se han visto patrones de estímulo-respuesta en la inducción de la metamorfosis, particularmente en respuesta a compuestos como la acetilcolina, 5-hidroxitriptamina, DOPA (dihidroxifenilalanina) y GABA (ácido gamma-aminobutírico), que funcionan como neurotransmisores en el sistema nervioso para el procesamiento de información y transducción de señales (Burke, 1983a). Este mismo autor señala que la inducción a la metamorfosis de *Dendraster* se da en respuesta a un localizado estímulo eléctrico. En *Haliotis* el reconocimiento de la larva al GABA, puede producir un flujo de aniones en el interior que es reconocido por células excitables externas (Morse, 1985). Este flujo probablemente resulta de la despolarización de la membrana lo cual es suficiente para inducir el asentamiento y la metamorfosis. El GABA induce a la metamorfosis a 12 especies de *Haliotis* (Morse y Morse, 1984b), al coral *Agaricia humilis* (Morse y Morse, 1993), al caracol *Trochus niloticus* (Tamashiro, et al. 1993) y al ostión *Crassostrea belcheri* (Tan y Wong, 1995), entre otros.

Se ha visto que algunos organismos también responden a ciertos cationes inorgánicos. Estos cationes posiblemente actúan cambiando el potencial eléctrico de las membranas externas de las células y simulando un estímulo natural. El ión mas efectivo para invertebrados marinos bentónicos es el potasio (Pearce y Scheibling, 1994), que aplicado en altas concentraciones se cree que despolariza las células, induciendo así el asentamiento y la metamorfosis. Ha sido utilizado en el prosobranquio *Crepidula fornicata* (Eyster y Pechenik, 1988); la demoesponja *Aplysilla* sp. (Woollacott y Hadfield, 1996); tres especies de briozoarios del género *Bugula* (Wendt y Woollacott, 1995); el

caracol de concha gigante *Strombus gigas* (Davis *et al.*, 1990), el abulón *Haliotis rufescens* (Searcy-Bernal y Salas-Garza, 1990), en los erizos *Lytechinus variegatus* (Cameron *et al.*, 1989), *Echinarachnius parma* y *Strongylocentrotus droebachiensis* (Pearce y Scheibling, 1994), así como también en gasterópodos, cnidarios, bivalvos y poliquetos (Hubbard, 1988; Splindler y Müller, 1972; Stricker, 1989; Nell y Holliday, 1986; Yool *et al.*, 1986).

En el erizo se han utilizado diferentes inductores químicos, con diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de exposición, algunos de los cuales se describen a continuación. En Japón han utilizado la L-glutamina y el GABA para inducir la metamorfosis en los erizos *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Pseudocentrotus depressus* (Yazaki y Harashima, 1994). Estos autores obtuvieron para *P. depressus* una inducción del 70% a una concentración de 3×10^{-4} M con un tiempo de exposición de 24 hrs con L-glutamina. En la misma especie pero con GABA obtuvieron una inducción del 60% a 1×10^{-5} M con el mismo tiempo de exposición. Con el erizo *H. pulcherrimus* las concentraciones adecuadas para inducir a la metamorfosis con L-glutamina fueron 10^{-3} y 10^{-4} M después de 24 hrs de tratamiento (Yazaki, 1995). Con GABA no obtuvo ningún tipo de respuesta a esas mismas concentraciones, ni con el cloruro de potasio (KCl) a concentración de 60 mM.

En Canadá la utilización del GABA en el erizo *Strongylocentrotus droebachiensis* indujo 70% a una concentración 10^{-1} M y el KCl en concentración de 10^{-3} M indujo el 92% (Pearce y Scheibling, 1990, 1994). Estos últimos autores utilizaron concentraciones de 2, 6, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mM de KCl para *S. droebachiensis* y *Echinarachnius parma*. Para el primero la concentración mas efectiva fue 10^{-1} M con 92% de metamorfosis y para el segundo las más recomendables fueron 40 y 60 mM con una inducción de 92 y 88%, respectivamente (Pearce y Scheibling, 1994).

En Chile, Segovia-Mattos (1994) utilizó GABA para inducir la metamorfosis en el erizo *Loxechinus albus*. Los resultados obtenidos mostraron que el efecto del GABA fue dependiente de la concentración, donde 10^{-5} M fué la concentración óptima.

Las diatomeas bentónicas se utilizan como un inductor natural para la metamorfosis (Yazaki, 1995; Pearce y Scheibling, 1991). Aunque Morse (1984) sugiere que las diatomeas no actúan por si solas como estímulo, sino que bacterias asociadas a éstas son las que provocan la inducción.

En el erizo rojo *S. franciscanus* no se tienen antecedentes de inductores químicos utilizados. Se han utilizado las diatomeas bentónicas, con una inducción del 60 al 90 %, pero las poslarvas presentan altas mortalidades debido a la falta de emersión de la mandíbula (Rogers-Bennett *et al.*, 1994). Las poslarvas presentan un círculo rojo en la membrana peristomal por encima del orificio bucal, lo que les impide una mandíbula funcional, y concluir la metamorfosis y por lo que finalmente mueren. También se han utilizado sustratos microbianos que sirven como señales naturales para inducir el asentamiento y la metamorfosis en el erizo rojo (Cameron y Schroeter, 1980)

Tomando en cuenta los resultados que se han obtenido con estos inductores químicos en otras especies de erizo, se aplicaron a larvas competentes del erizo rojo *S. franciscanus* con la finalidad de evaluar su efecto en la inducción en la metamorfosis y en la obtención de juveniles. Se espera que con algunos de estos inductores se obtenga una sincronización en la metamorfosis que permita mejorar la sobrevivencia y la cantidad de juveniles como parte del desarrollo biotecnológico en la producción de semilla.

3- OBJETIVO

* Evaluar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición de los inductores químicos cloruro de potasio (KCl), ácido gama-aminobutírico (GABA) y L-glutamina en la metamorfosis, sobrevivencia, y desarrollo de la mandíbula en juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*.

4- METODOLOGÍA

Se realizaron dos experimentos, el procedimiento fue el mismo en ambos casos. Los experimentos se llevaron a cabo en enero-febrero para el primer experimento y marzo-abril para el segundo del año de 1999 en el Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en Ensenada.

4.1- Obtención de larvas competentes

Se desovaron erizos adultos con una talla mínima de 8 cm de testa, colectados en Campo Kennedy, municipio de Ensenada, B. C. La inducción al desove se hizo según el método descrito por Palmer (Strathmann, 1987) que consistió en inyectar cloruro de potasio a una concentración 0.55 M en la parte intercelómica. Se desovaron de manera individual en frascos de vidrio conteniendo agua de mar.

Para llevar a cabo la fertilización se utilizó el método descrito por Strathmann (1987). Los huevos en presencia de esperma, se dejaron sedimentar por un periodo de 10 a 15 minutos para completar la fertilización, la cual se observa por el levantamiento de la membrana de fertilización, que ha sido descrita en diversos invertebrados marinos (Chase, 1967; Epel, 1978). Los huevos fertilizados se lavaron con agua de mar a través de un tamiz de 48 μm para quitar el exceso de esperma. Por último los óvulos fertilizados se colocaron en recipientes de 18 litros sin aireación durante 48 horas, tiempo que tarda en desarrollarse la larva prisma.

Las larvas se mantuvieron en tanques cónicos de 180 litros con agua de mar filtrada a 1 μm e irradiada con luz UV. El desarrollo larvario tuvo una

duración de 22 días a una temperatura de $14 \pm 1^\circ\text{C}$ y 19 días con una temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$, en el primer y segundo experimento respectivamente. La densidad del cultivo se inició a 1 larva/ml, y fueron alimentadas con las microalgas *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* sp. en proporción de 60 y 40 % respectivamente. La ración diaria de alimento se aumentó cada semana de la siguiente manera: 10,000, 15,000 y 20,000 cel/ml. Recambios de agua del 50% del volumen se hicieron cada tercer día y del 100% una vez por semana. Las larvas fueron contadas cada semana hasta el inicio del experimento (fig. 1).

4.2- Diseño experimental

4.2.1- Inducción a la metamorfosis

Se indujo a la metamorfosis cuando más del 80% de las larvas se consideraron competentes (ver sección 4.3). Las características por las cuales se diferenciaron fueron la presencia del rudimento juvenil; que en esta etapa ocupa la mitad izquierda del cuerpo de la larva, los cinco pies ambulacrales bien desarrollados y la tendencia a estar más cerca del fondo (Burke, 1980). También se pudo observar que los brazos se flexionan hacia su lado derecho y se hacen más pequeños, con el fin de dejar expuesto su lado izquierdo y facilitar que los pies ambulacrales del juvenil se sujeten al sustrato, como sucede también en el erizo *Lytechinus pictus* (Hinegardner, 1969).

En los dos experimentos se introdujeron 200 larvas en frascos de vidrio de 1 litro con 200 ml de agua de mar filtrada a $1 \mu\text{m}$ e irradiada por luz UV. Para el primer experimento se utilizaron tres concentraciones de cada inductor 10^{-1} M, 10^{-5} M y 10^{-10} M, expuestos por 24 horas. Además se realizaron los

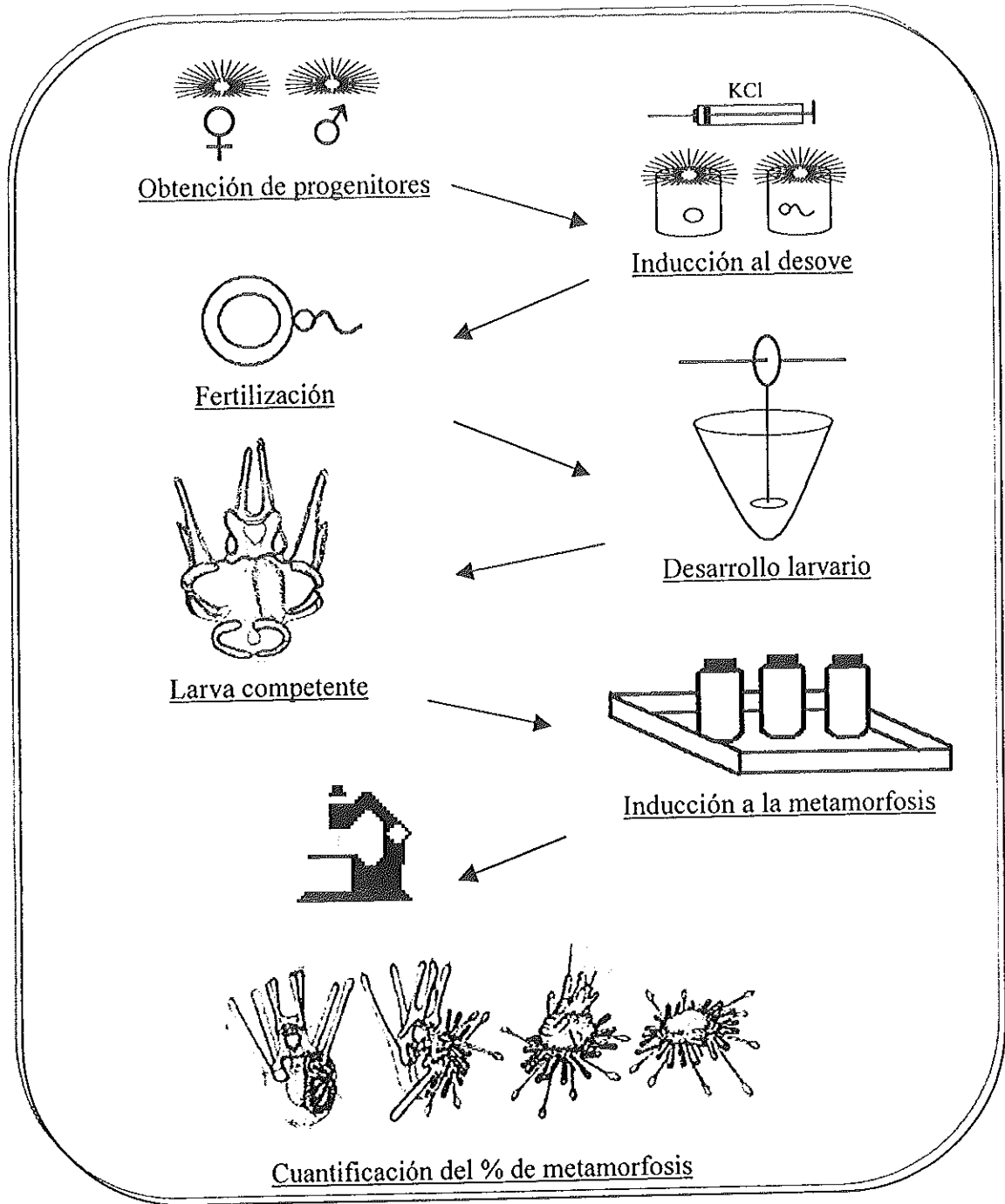


Fig. 1 Diagrama de flujo que muestra de manera esquemática la metodología utilizada para la realización de los experimentos.

Inductores	Tiempo de exposición horas	Concentración Molar (M)	Réplicas		
			1	2	3
Primer Experimento					
KCl	24	10^{-1}	☐	☐	☐
		10^{-5}	☐	☐	☐
		10^{-10}	☐	☐	☐
GABA	24	10^{-1}	☐	☐	☐
		10^{-5}	☐	☐	☐
		10^{-10}	☐	☐	☐
L-glutamina	24	10^{-1}	☐	☐	☐
		10^{-5}	☐	☐	☐
		10^{-10}	☐	☐	☐
Control positivo	24	-	☐	☐	☐
Control negativo	24	-	☐	☐	☐
Segundo Experimento					
KCl	24	10^{-3}	☐	☐	☐
		10^{-5}	☐	☐	☐
		10^{-7}	☐	☐	☐
		10^{-5} Sin manejo	☐	☐	☐
GABA	24	10^{-5}	☐	☐	☐
		10^{-7}	☐	☐	☐
		10^{-10}	☐	☐	☐
		10^{-5} Sin manejo	☐	☐	☐
L-glutamina	24	10^{-3}	☐	☐	☐
		10^{-5}	☐	☐	☐
Control positivo	24	- Sin Manejo	☐	☐	☐
Control negativo	24	-	☐	☐	☐
KCl	3	10^{-1}	☐	☐	☐
GABA	3	10^{-1}	☐	☐	☐

Fig. 2. Diseño experimental. Inducción a la metamorfosis de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* con diferentes inductores.

inducción a la metamorfosis se llevó a cabo a las 24 y 72 horas después de aplicar el inductor para el primer y segundo experimento. El pulso se evaluó a las 3, 24 y 72 hrs. En el segundo experimento se hicieron observaciones cada dos días durante los 27 días posteriores hasta completar la metamorfosis .

Para detener el efecto del inductor se hizo recambio de agua. Se lavaron las larvas con agua de mar filtrada a 1 μm e irradiada con luz UV. Se utilizó un tamiz de 106 μm para retener las larvas. Del tamiz se tomó una muestra al azar que se colocó en una camarilla de conteo. Se evaluaron las primeras 25 larvas al azar en el primer experimento y 30 larvas en el segundo experimento. Se clasificaron de la siguiente manera: a) larva competente: presencia del rudimento juvenil, pies ambulacrales, simetría bilateral (fig. 3, A1 y A2); b) larva en proceso de metamorfosis: absorción del epitelio larval, exposición del rudimento (fig. 3, B1 y B2), presencia de espinas, simetría radial (fig. 3, C) ya fuera viva o muerta. (Nota: se utilizó el inciso b en la graficación de los resultados).

4.3.2- Desarrollo de la mandíbula

Después de cinco días de la inducción a la metamorfosis se les agregó como alimento diatomeas bentónicas a todos los tratamientos del segundo experimento. La metamorfosis completa incluye el desarrollo de órganos internos del adulto, el sistema digestivo, una mandíbula funcional y el ano (Hinegardner, 1969; Cameron y Hinegardner, 1974). La metamorfosis se dió por terminada hasta que la mandíbula era visible y funcional. Se hicieron observaciones tomando muestras de las poslarvas del segundo experimento cada dos días por medio del microscópio compuesto para determinar la presencia externa de la mandíbula en la parte oral, evaluándose a partir del día 17. Una manifestación indirecta de una mandíbula funcional fue el rastro de

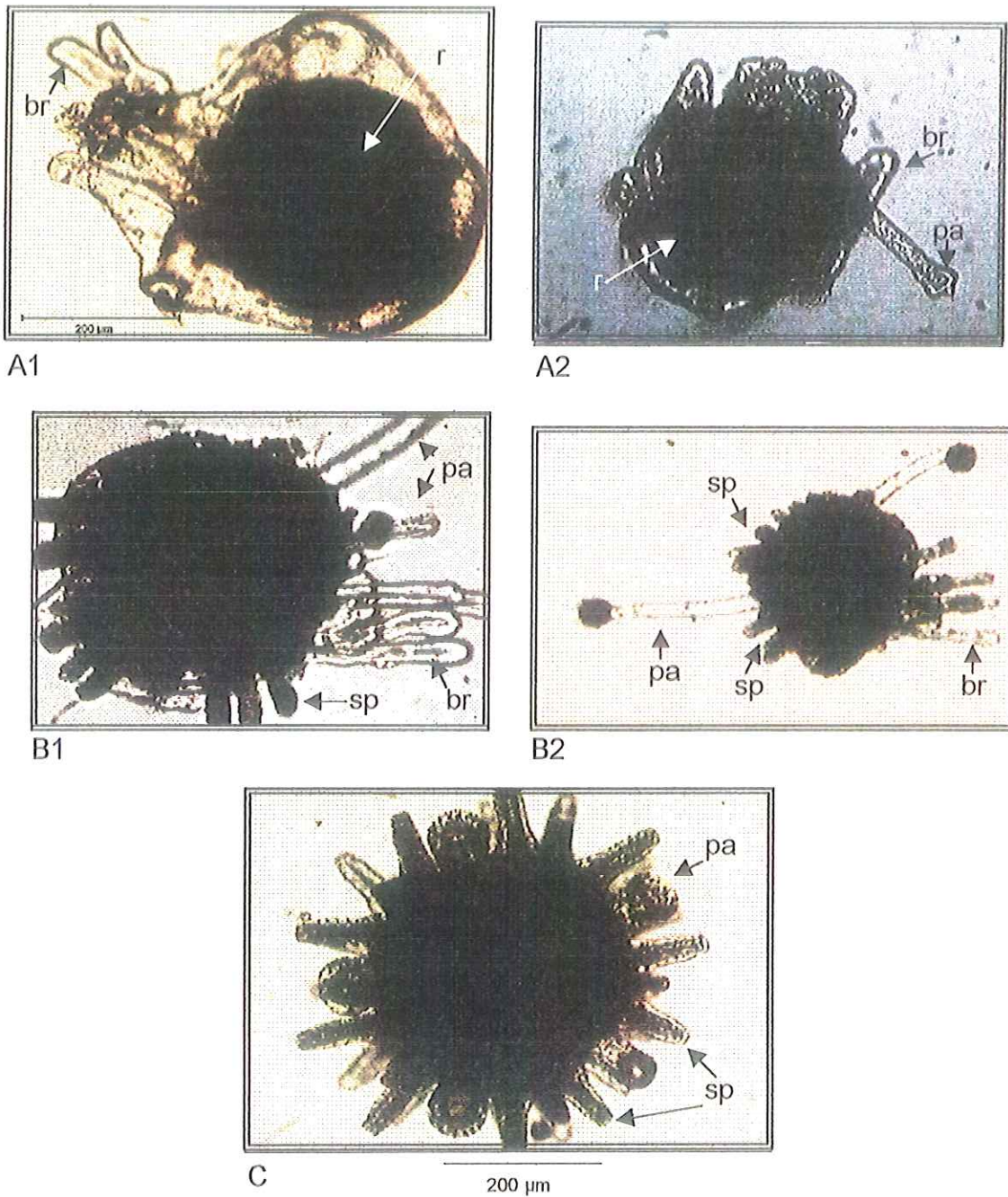


Fig. 3. Diferentes estadios del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. A1 y A2 corresponden a larva competente; B1 y B2 corresponden a larvas en proceso de metamorfosis y C corresponde a poslarva. br- brazo; pa- pies ambulacrales; r- rudimento; sp- espinas

espacios claros que dejaron los erizos en los frascos al alimentarse con las diatomeas.

4.3.3- Supervivencia de juveniles

Se evaluó la supervivencia a los 10, 17 y 27 días, para lo cual se efectuaron conteos directos de todos los juveniles presentes. Para calcular el porcentaje de supervivencia se consideró como 100% a las 200 larvas iniciales que se introdujeron en cada frasco y que fueron inducidas a la metamorfosis.

4.4- Diseño experimental

El modelo experimental consistió de dos factores fijos, cumpliéndose las características de aleatoriedad y réplicas. Los factores fijos fueron el inductor y la concentración, el número de réplicas fueron tres en todos los casos.

Modelo lineal factorial (Montgomery, 1983)

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

donde:

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

μ = Media poblacional.

α_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (inductor).

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

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

ε_{ijk} = es el error asociado con la k-ésima en el subgrupo.

El diseño experimental que representa el modelo utilizado se muestra en la fig. 2.

4.5- Análisis estadístico

El modelo experimental de dos factores fijos, correspondientes al inductor y la concentración, se realizó a través de un análisis de varianza (ANDEVA), de dos vías, al cumplir la condición de homogeneidad de varianzas. Se utilizaron los programas estadísticos, SIGMA STAT y STATISTICA versión 4.2. Cuando se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) se realizaron contrastes múltiples con la prueba de Tukey HSD (por sus siglas en inglés: Honest Significant Difference) para el mismo número de observaciones.

Los juegos de hipótesis estadísticas a probar fueron las siguientes:

H_0 = No hay diferencias en la metamorfosis obtenida entre los inductores KCl, GABA, L-glutamina.

H_A = Si hay diferencias en la metamorfosis obtenida entre los inductores KCl, GABA, L-glutamina.

H_0 = No hay diferencias en la metamorfosis obtenida entre las concentraciones utilizadas para cada inductor.

H_A = Si hay diferencias en la metamorfosis obtenida entre las concentraciones utilizadas para cada inductor.

5- RESULTADOS

5.1- Primer experimento

Metamorfosis

Las larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* respondieron a los inductores químicos KCl, GABA y L-glutamina. La metamorfosis promedio obtenida fue diferente entre los inductores químicos, donde el KCl y el GABA fueron significativamente diferentes con la L-glutamina ($p < 0.05$, tabla I, ver anexo). A su vez presentaron diferencias ($p < 0.001$, tabla I ver anexo) las concentraciones utilizadas, donde la concentración 10^{-1} M fue diferente a 10^{-5} M y 10^{-10} M. Además, hubo interacción ($p < 0.001$, tabla I, ver anexo) entre los inductores y la concentración en la metamorfosis promedio. De las hipótesis estadísticas planteadas se aceptó la alterna en ambos casos.

El mayor porcentaje de metamorfosis estuvo relacionado con la concentración 10^{-1} M para los tres inductores, pero así también la menor sobrevivencia.

La metamorfosis promedio obtenida con KCl estuvo directamente relacionada con la concentración del inductor. En la evaluación realizada a las 24 horas, el máximo porcentaje de metamorfosis del 100% se obtuvo con el tratamiento de la concentración 10^{-1} M y el mínimo de 23% con el tratamiento 10^{-10} M. En el control positivo se obtuvo 68% y en el control negativo 44% de metamorfosis para ese tiempo. A las 72 horas el porcentaje de metamorfosis fue de 80% para 10^{-5} M y de 59% para 10^{-10} M. En los controles positivo y negativo se obtuvo 52% y 60% de metamorfosis respectivamente. La sobrevivencia fue del 21% para el tratamiento 10^{-1} M y del 41% para 10^{-5} M y la

mayor fué para 10^{-10} M con el 100% de sobrevivencia de las poslarvas (fig. 4). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las tres concentraciones utilizadas, con respecto al tratamiento con la concentración 10^{-1} M con el tratamiento sin inductor (control negativo) ($p= 0.0005$, tabla II, ver anexo) y con las diatomeas bentónicas (control positivo) ($p= 0.0229$, tabla II, ver anexo). El tratamiento 10^{-10} M mostró diferencias con las diatomeas bentónicas (control positivo) ($p=0.0023$, tabla II, ver anexo).

El porcentaje de metamorfosis obtenido con GABA, mostró que en el tratamiento con 10^{-1} M se obtuvo 69% de metamorfosis como máximo y la mínima fué de 36% con 10^{-10} M para las 24 horas pos-inducción. Para las 72 horas la metamorfosis observada tuvo un valor máximo de 100% con el tratamiento 10^{-1} M y un mínimo de 59% con 10^{-10} M. La sobrevivencia fue de 0% para el tratamiento 10^{-1} M y del 41% para 10^{-5} M. (fig. 4). El análisis estadístico mostró que sólo el tratamiento con la concentración 10^{-10} M fue diferente a los tratamientos 10^{-1} M ($p=.0180$, tabla II, ver anexo) y al del control positivo ($p=0.0229$, tabla II, ver anexo).

Con L-glutamina se obtuvo un máximo de 55% de metamorfosis en el tratamiento de la concentración 10^{-10} M y la mínima de 20% con el tratamiento 10^{-5} M para las 24 hrs. Para las 72 horas los porcentajes de metamorfosis se invirtieron, obteniéndose un 100% de metamorfosis con el tratamiento 10^{-1} M y un mínimo de 37% con el de 10^{-10} M. La sobrevivencia estuvo inversamente asociada a las concentraciones del inductor, obteniéndose el 0% en el tratamiento 10^{-1} M y del 35% para el tratamiento 10^{-5} M (fig. 5). Se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento 10^{-5} M y 10^{-10} M ($p=0.0275$, tabla II, ver anexo) y de los tratamientos 10^{-1} M ($p=0.0144$, tabla II, ver anexo) y 10^{-5} M ($p= 0.0034$, tabla II, ver anexo) con el control positivo

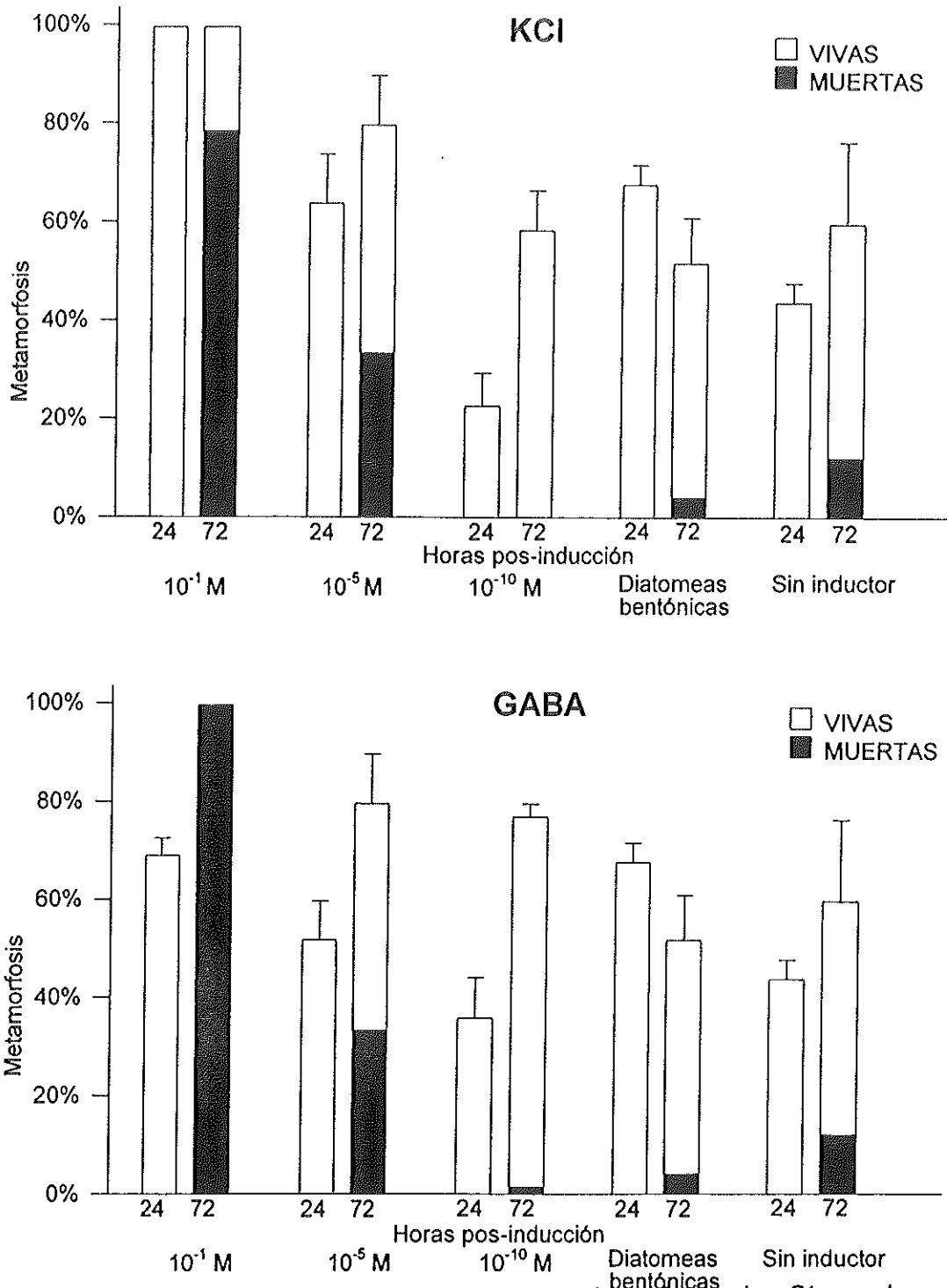


Fig.4. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 24 y 72 horas después de la inducción con KCl y GABA a diferentes concentraciones 10^{-1} , 10^{-5} y 10^{-10} M. Promedio obtenido en tres muestras al azar de 25 organismos cada una. La barra vertical equivale al error estándar. (Diatomeas bentónicas = control positivo, sin inductor = control negativo)

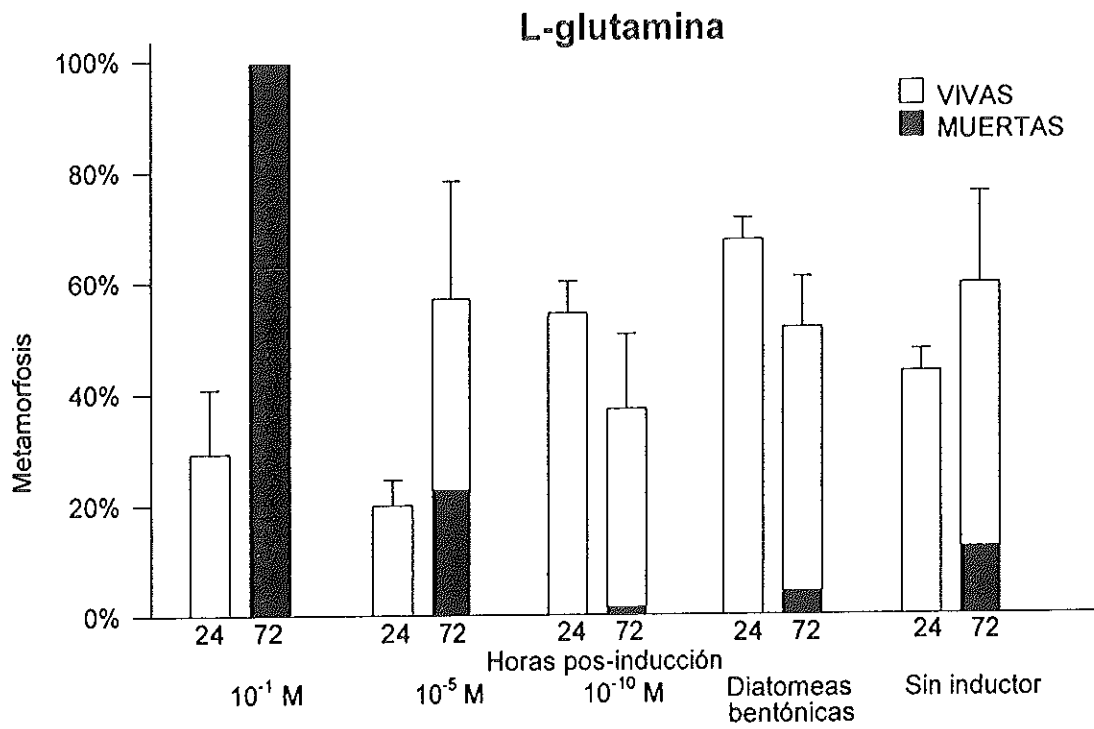


Fig.5. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 24 y 72 horas después de la inducción con L-glutamina a diferentes concentraciones 10⁻¹, 10⁻⁵ y 10⁻¹⁰ M. Promedio obtenido en tres muestras al azar de 25 organismos cada una. La barra vertical equivale al error estándar. (Diatomeas bentónicas = control positivo; Sin inductor = control negativo)

5.2- Segundo experimento

Metamorfosis

La metamorfosis obtenida con las concentraciones de inductores utilizadas en el segundo experimento coincidieron en gran medida con los resultados del primer experimento donde la metamorfosis mostró una relación directa con la concentración del inductor.

Desafortunadamente no fue posible evaluar los tratamientos de L-glutamina y diatomeas bentónicas, debido a un crecimiento masivo de protozoarios, por lo que se consideró que los resultados obtenidos no eran confiables.

En los tratamientos donde se utilizó KCl como inductor se obtuvo el valor máximo de metamorfosis del 61% en la concentración 10^{-3} M en las primeras 24 horas. Para las 72 horas el 96% de las larvas del tratamiento 10^{-3} M habían iniciado el proceso de metamorfosis, que fué el valor máximo. El mínimo fué de 77% con la concentración 10^{-7} M (fig. 6). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas ni con el control negativo ($p= 0.06$, tabla III, ver anexo).

De las larvas inducidas con GABA, el mayor porcentaje de metamorfosis se obtuvo con el tratamiento 10^{-7} M con 73%, y el mínimo de 48% con el tratamiento 10^{-10} M a las 24 horas. A las 72 horas, se obtuvo un porcentaje de metamorfosis mayor del 90% en los tratamientos 10^{-5} y 10^{-7} M y del 70% para la concentración 10^{-10} M (Fig. 6). Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 10^{-7} M y el control negativo ($p= 0.0034$, tabla IV, ver anexo).

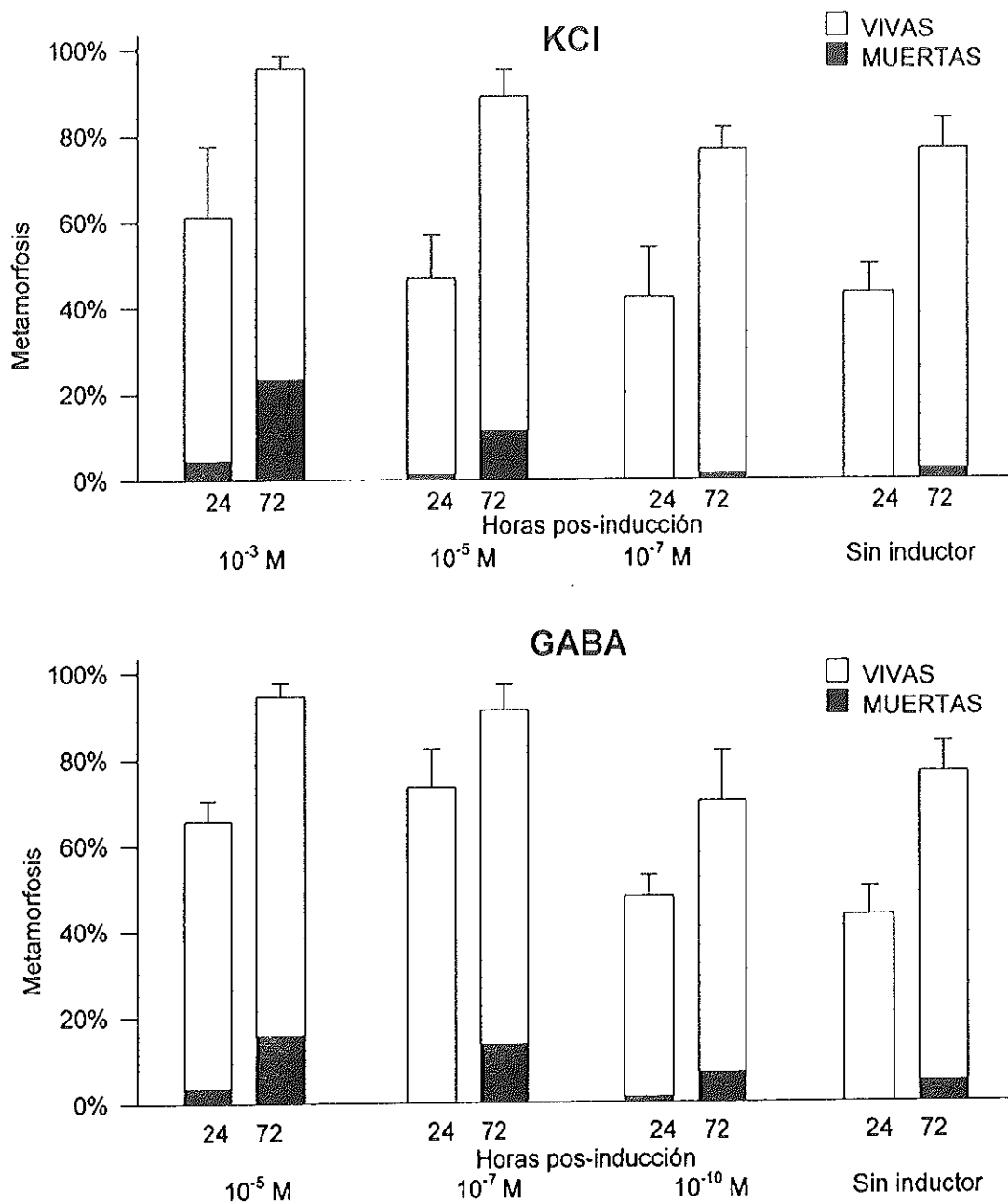


Fig.6. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 24 y 72 horas después de la inducción con KCl (10⁻³, 10⁻⁵ y 10⁻⁷ M) y GABA (10⁻⁵, 10⁻⁷ y 10⁻¹⁰ M) a diferentes concentraciones. Promedio obtenido en tres muestras al azar de 25 organismos cada una. La barra vertical equivale al error estándar. (Diatomeas bentónicas = control positivo; Sin inductor = control negativo)

En el pulso, donde las larvas estuvieron expuestas por tres horas a los inductores KCl y GABA en concentración de 10^{-1} M, se obtuvo que el 50% de las larvas tratadas con KCl y 61% de las tratadas con GABA iniciaron la metamorfosis. Se observó que la metamorfosis a las 24 horas incrementó al 63% con el KCl y al 90% con el GABA. 72 horas posteriores a la inducción, un total de 87% de larvas habían iniciado la metamorfosis con KCl y 92% con GABA. La sobrevivencia fue del 84% en el caso de KCl y 87% para el GABA (fig. 7).

5.3- Sobrevivencia de juveniles

La sobrevivencia se evaluó a los 10, 17 y 27 días después de la inducción a la metamorfosis para todos los tratamientos de KCl y GABA. Las larvas que fueron inducidas con KCl se obtuvo el 29% de sobrevivencia en promedio de todos los tratamientos a los 10 días pos-inducción, sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos ($F=1.197$, g.l.= 3, $p= 0.31$). Para los 17 días la sobrevivencia fue de 27%, igualmente sin diferencias ($F= 0.777$, g.l.= 3, $p= 0.53$) y del 20% a los 27 días. El tratamiento con la mayor sobrevivencia a los 27 días fue la concentración 10^{-5} M con 27% (fig. 8), aunque no tuvo diferencias significativas con los otros tratamientos ($F= 0.817$, g.l.= 3, $p= 0.52$).

El promedio obtenido para los tratamientos inducidos con GABA a los 10 días pos-inducción fue del 28%, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($F= 0.60$, g.l.= 3, $p= 0.63$). De igual manera no se encontraron diferencias ($F= 0.0139$, g.l.= 3, $p= 0.99$) en la sobrevivencia a los 17

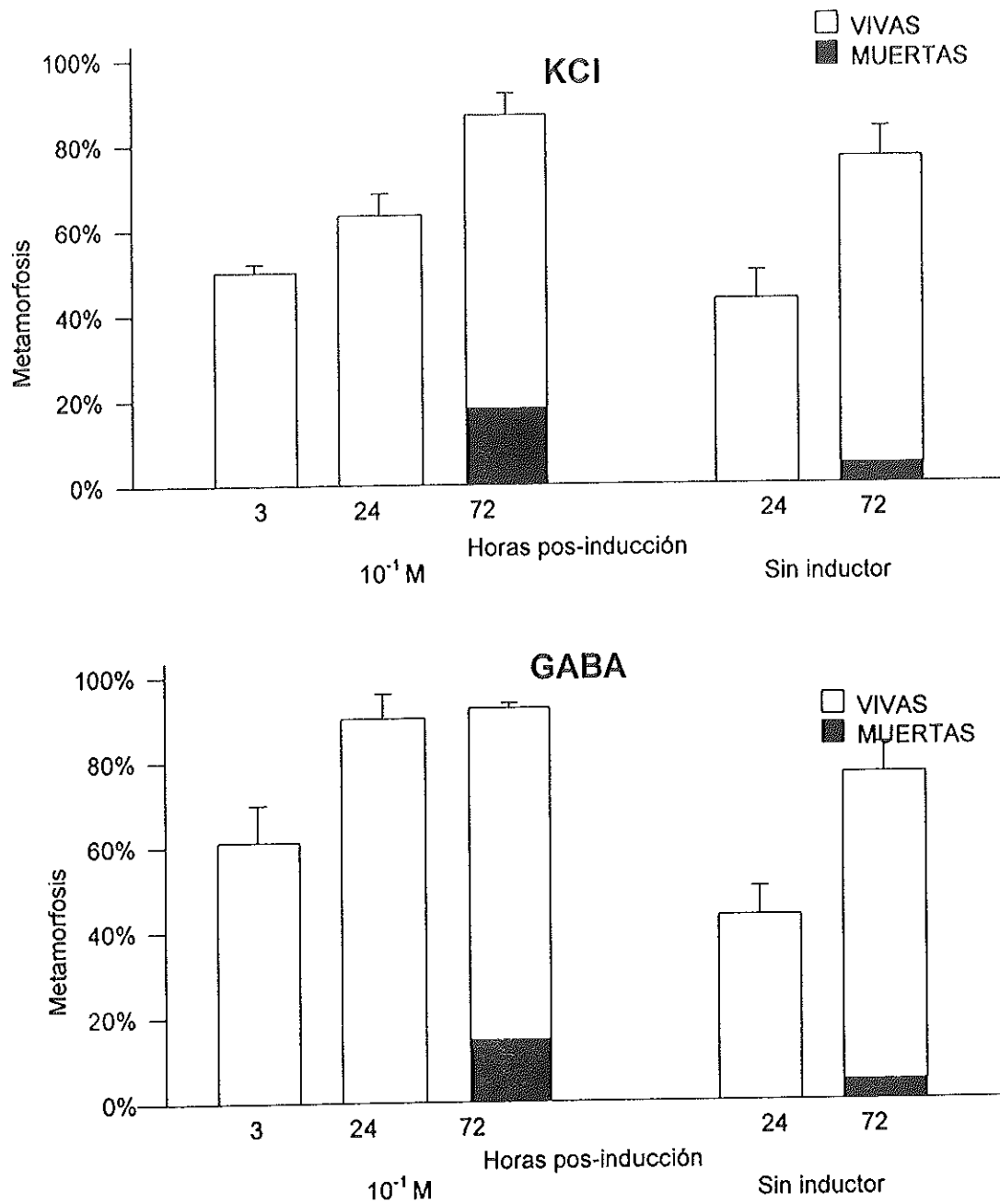


Fig.7. Metamorfosis obtenida en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 3, 24 y 72 horas después de la inducción con KCl y GABA a concentración de 10^{-1} M. Promedio obtenido en tres muestras al azar de 25 organismos cada una. La barra vertical equivale al error estándar. (Diatomeas bentónicas = control positivo; Sin inductor = control negativo)

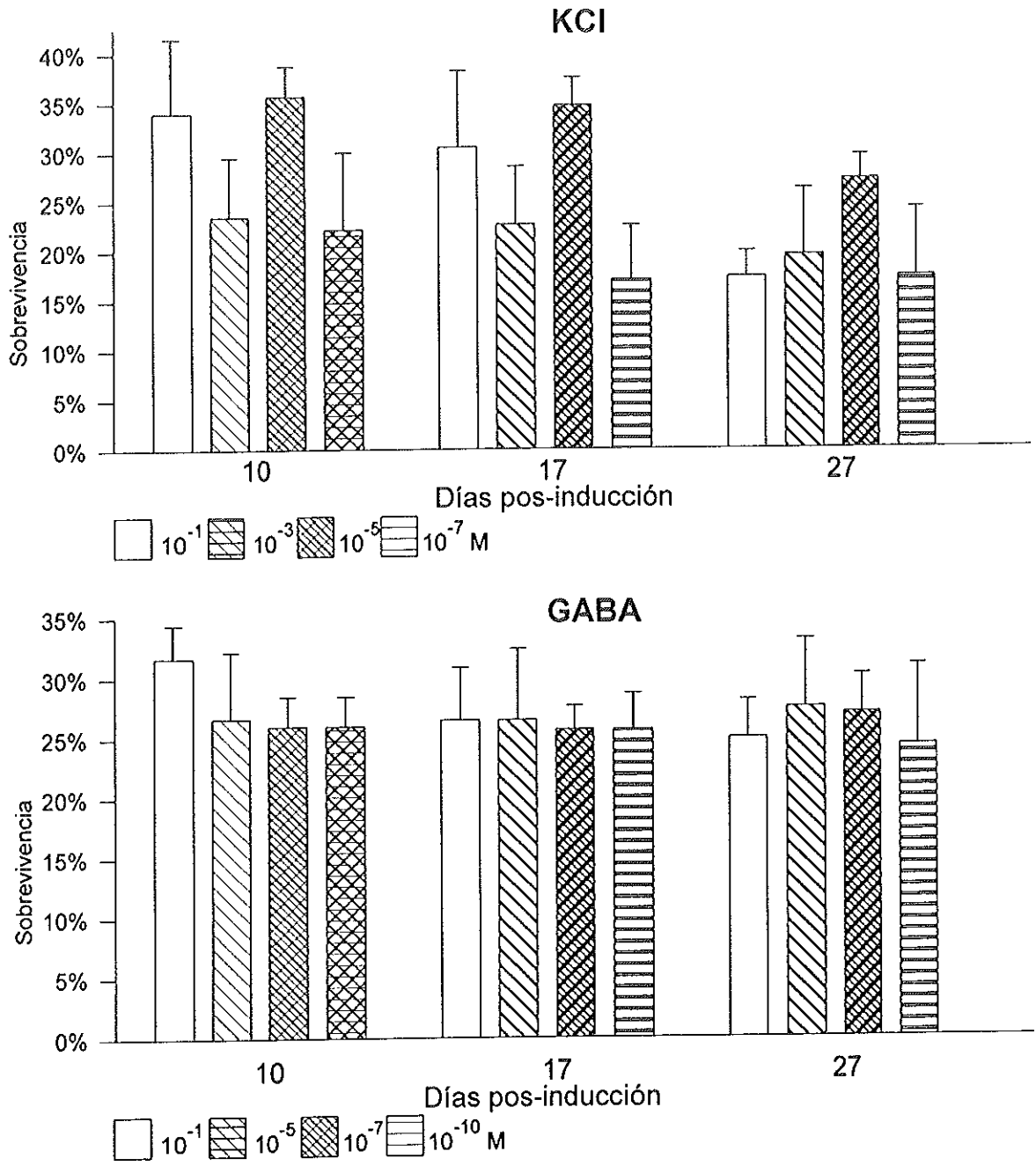


Fig.8. Porcentaje de sobrevivencia obtenida de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, 10, 17 y 27 días después de la inducción a la metamorfosis con KCl y GABA a diferentes concentraciones. Promedio obtenido en tres réplicas. La barra vertical equivale al error estándar.

días, donde la sobrevivencia promedio fue del 27%. En el conteo a los 27 días la sobrevivencia fué del 26% (Fig. 8). Para ese momento el tratamiento con la concentración 10^{-5} M fue el de la mayor sobrevivencia con 28%, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 0.097$, $gl.l= 3$, $p=0.95$).

Los tratamientos que no se manipularon y que fueron utilizados para evaluar el posible efecto del manejo en la sobrevivencia no mostraron diferencias ($p<0.05$) para ningún tratamiento. La sobrevivencia a los 27 días pos-inducción obtenida en el tratamiento de KCl 10^{-5} M sin manejo fue de 20% y con manejo de 23%, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$, tabla V, ver anexo). En el tratamiento de GABA 10^{-5} M que no se manipuló la sobrevivencia fue de 26% y en el que estuvo expuesto al manejo de 30% y no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$, tabla V, ver anexo)

5.4- Desarrollo de las mandíbulas

A los 17 días después de la inducción los juveniles tratados con KCl presentaron en un 68% en promedio las mandíbulas bien desarrolladas. Para los 27 días el 100% de los tratamientos con la concentración 10^{-5} y 10^{-7} M presentaron juveniles con mandíbula funcional (fig. 9).

Los juveniles que fueron inducidos a la metamorfosis con GABA presentaron a los 17 días posteriores a la inducción un promedio de 81% de presencia de mandíbulas. A los 27 días la totalidad de las poslarvas de todos los tratamientos presentaban la mandíbula bien desarrollada y funcional.

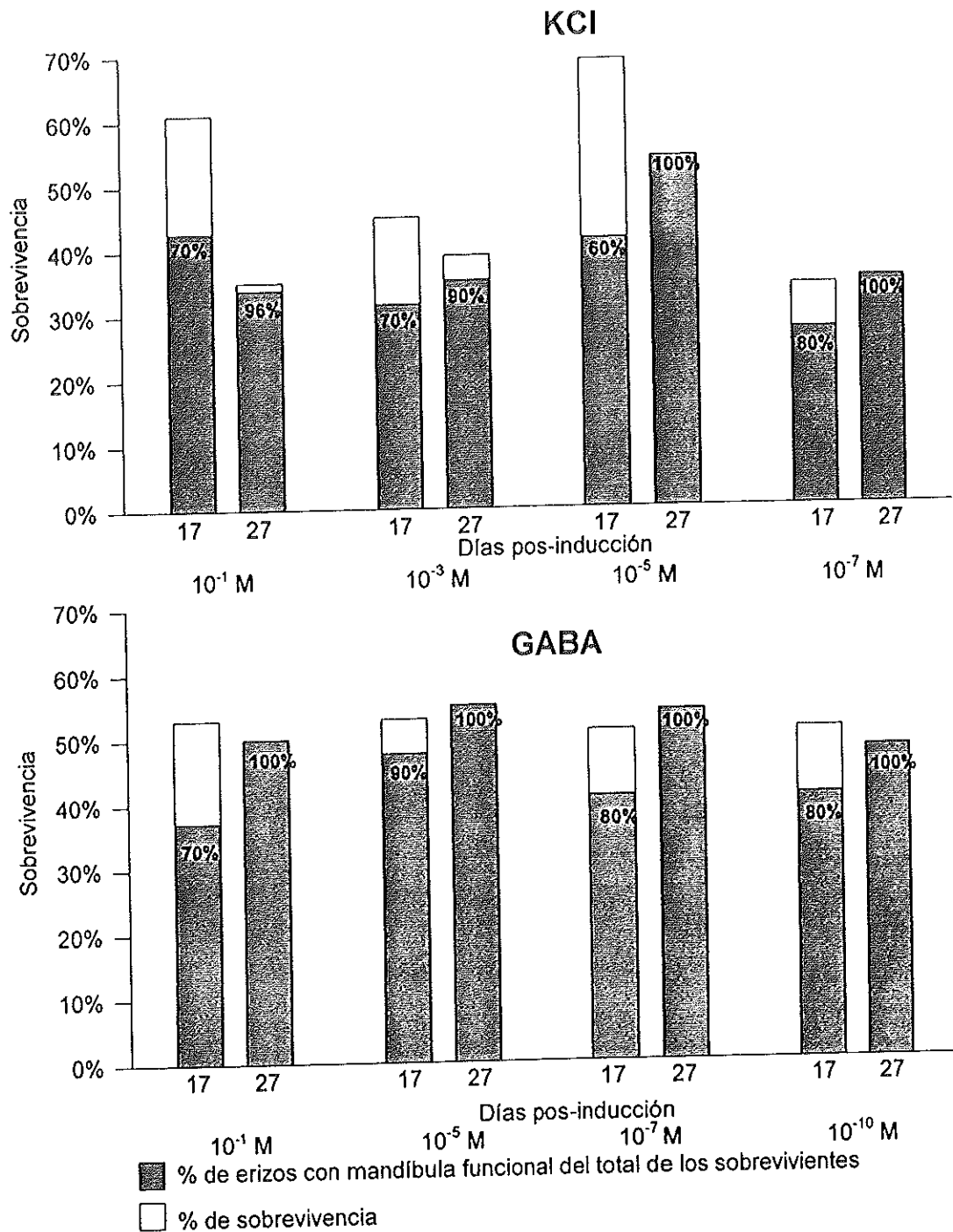


Fig. 9. Porcentaje de juveniles de *Strongylocentrotus franciscanus* que presentaron mandíbula funcional, en relación al 100% de los sobrevivientes. Los muestreos se realizaron a los 17 y 27 días después de la inducción a la metamorfosis con KCl y GABA a diferentes concentraciones. Promedio obtenido en tres muestras al azar de 10 organismos.

6- DISCUSIÓN

6.1- Metamorfosis

La larva del erizo rojo *S. franciscanus* fue inducida a la metamorfosis y completó su proceso hasta juvenil cuando fue expuesta al KCl, GABA y L-glutamina, lo cual indica que no es específica de un inductor. En el aspecto biotecnológico en el proceso de producción de semilla de juveniles, esa generalidad de la larva facilita la elección de un inductor accesible y económico. Por otro lado en el medio marino representa una ventaja para la larva, ya que al ser transportadas principalmente por las corrientes oceánicas cientos de kilómetros de su lugar de origen (Strathmann, 1987; Cameron y Schroeter, 1980), pueden ser sensibles y metamorfizarse ante una variedad mas amplia de sustratos. Lo anterior también puede ocasionar que la larva inicie la metamorfosis en condiciones menos favorables para su desarrollo y por consecuencia morir.

Los inductores KCl, GABA y L-glutamina fueron eficientes para iniciar el proceso de metamorfosis en las larvas de erizo rojo, aunque la concentración mayor de 10^{-1} M, resultó tener un efecto tóxico hacia las poslarvas (figs. 4 y 5). Sin embargo para otras especies, esta concentración sólo inhibe el asentamiento y la metamorfosis, como se reporta para tres especies de briozoarios del género *Bugula* (Lynch, 1949), que al ser expuestas al KCl en concentración de 10^{-1} M, mostraron el comportamiento anteriormente mencionado y en concentraciones por arriba de 35×10^{-2} M, iniciaron pero no culminaron la metamorfosis (Wendt y Woollacott, 1995). Por otro lado las larvas en este estudio, expuestas a una menor concentración de KCl (10^{-3} - 10^{-10} M), alcanzaron porcentajes de metamorfosis por arriba del 59% (figs. 4 y 6) con una sobrevivencia final mayor a 35% (fig. 8). Con lo anterior se puede suponer

que estas concentraciones no afectaron a las larvas durante el proceso de metamorfosis del erizo rojo. Cabe destacar que en el control negativo (sin inductor) el porcentaje máximo alcanzado de metamorfosis fue del 77% y en el control positivo (diatomeas bentónicas) con 52% (figs 4-6)(tablas I y III, ver anexo). Esto puede revelar que la metamorfosis alcanzada en las diferentes concentraciones utilizadas no sean necesariamente por efecto del inductor y las larvas se hayan metamorfozido por causas diferentes, o incluso que ya hubieran estado en inicio de metamorfosis al momento de la inducción, aunque en el monitoreo de la condición de las larvas antes de depositarlas en los frascos experimentales, no excedía del 18% las larvas que estaban en inicio de metamorfosis. Este hecho podría aportar evidencias de la poca especificidad de las larvas al inductor, ya que el agua filtrada a $1\mu\text{m}$ y pasada por luz UV, no excluía bacterias ni sustancias disueltas que a muy baja concentración pudieran actuar como inductores al estar en contacto con las larvas. Como se observa en las figs. 4-7, el control negativo tuvo porcentajes de metamorfosis muy similares a los alcanzados por los tratamientos con la menor concentración, donde se puede suponer que a esa concentración no tuvo efecto alguno el inductor aplicado y la metamorfosis obtenida fue resultado únicamente del agua de mar. En el trabajo de Pearce y Scheibling (1994) utilizaron para su experimento agua filtrada a $0.45\mu\text{m}$ y el porcentaje de metamorfosis obtenido en las unidades experimentales sin inductor fue del 2%, esto puede sustentar lo planteado anteriormente. Estos últimos autores reportan que la utilización de una concentración de 10^{-3} M de KCl en el equinodermo *Echinarachnius parma*, resultó ser tóxico, y en concentraciones de 1.2×10^{-2} y 2.4×10^{-2} M el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a ese mismo inductor no indujo a la metamorfosis (Rowley, 1989). Si bien, en otros invertebrados marinos como el gasterópodo *Crepidula fornicata* con concentraciones de KCl de 2×10^{-2} M obtuvieron el 100% de metamorfosis (Pechenick y Heyman, 1987).

El GABA estimuló favorablemente a las larvas competentes y se alcanzaron porcentajes de metamorfosis por arriba del 90% en los tratamientos con las concentraciones 10^{-5} M y 10^{-7} M (figs. 4 y 6). Estos resultados fueron similares a los reportados para otros invertebrados marinos, como el abulón *Haliotis rufesens*, donde la concentración óptima para inducir la metamorfosis es 10^{-6} M (Morse, *et al.* 1980). De la misma manera estos resultados son consistentes para las larvas del ostión *Crassostrea belcheri*, donde indujo un 58% a la metamorfosis a la misma concentración (Tan y Wong, 1995). Esto sugiere que la sensibilidad para la respuesta a la metamorfosis con GABA es semejante en diferentes especies de invertebrados marinos.

Se ha propuesto la teoría de que el efecto del GABA sobre las larvas es debido a la interacción de éste con los receptores de la membrana que controla el cambio iónico, lo cual provoca una despolarización, y por consecuencia la larva se metamorfiza. Esto fue descrito para larvas de abulón *Haliotis* por Baloun y Morse (1984). En cambio, en algunas especies tales como el erizo *Pseudocentrotus depressus* y *Hemicentrotus pulcherrimus* la inducción con GABA no es eficiente. Esto se comprobó cuando se utilizó GABA a una concentración 10^{-7} M con *P. depressus*, donde las larvas presentaron un rápido doblamiento de los brazos y evertimiento del rudimento juvenil, pero a las pocas horas recobraron su aspecto larval (Yazaki y Harashima, 1994). Cuando el GABA se aplicó para *H. pulcherrimus* las concentraciones oscilaron entre 10^{-4} y 10^{-6} M y no indujo a la metamorfosis (Yazaki, 1995). Resultados similares se obtuvieron cuando se expuso al gasterópodo *Crepidula fornicata*, al GABA a 4×10^{-7} y 4×10^{-6} M, donde no tuvo ningún efecto (Pechenik y Heyman, 1987). No obstante es importante resaltar que a pesar de los buenos efectos del GABA sobre las larvas del erizo rojo, no se tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) con los controles positivo y negativo, posiblemente por las mismas causas explicadas con anterioridad cuando se utilizó KCl como inductor.

Las larvas del erizo rojo tuvieron una reacción menos sincrónica con el compuesto L-glutamina a diferencia del KCl y el GABA. Se observó que la metamorfosis inició hasta las 72 horas posteriores a la inducción (fig. 5). Esto pudo ser debido a que la sensibilidad de la larva ante la L-glutamina es diferente, lo que hace que la metamorfosis no se desencadene tan rápido como con KCl y GABA. Cuando se utilizó L-glutamina en el erizo *Hemicentrotus pulcherrimus* mostró tener efectos inhibitorios en la actividad mitótica de las células epiteliales cuando el tiempo de inducción fue prolongado (Yazaki, 1995). Cuando este autor indujo a la metamorfosis a *H. pulcherrimus* con L-glutamina las larvas iniciaron la metamorfosis hasta 48 horas después de la inducción. Esto coincide con lo reportado para *Pseudocentrotus depressus* (Yazaki y Harashima, 1994). Aun con lo expuesto anteriormente, en la presente investigación el mayor porcentaje de metamorfosis estuvo relacionado con la mas alta concentración del inductor, aunque cabe destacar que la concentración alta (10^{-1} M), fue tóxica para las larvas de *S. franciscanus*. Para *H. pulcherrimus* y *P. depressus* los autores no reportan la sobrevivencia, por lo que se hace énfasis, que en este tipo de experimentos es importante darle seguimiento a las poslarvas hasta completar la metamorfosis, ya que el inductor puede inducir la metamorfosis, pero horas o días después tener consecuencias fatales.

Otra alternativa para aplicar inductores es en forma de cristales, como se ha sugerido para la glutamina. Cuando se utilizó en los erizos *Strongylocentrotus intermedius* y *Scaphechinus mirabilis*, se obtuvo 100% y 50% de metamorfosis respectivamente agregando $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, el estímulo a la metamorfosis resultó de la formación de un gradiente en la concentración al momento de disolverse los cristales (Naidenko, 1996). Cuando se busca un inductor en la aplicación de una biotecnología para producir juveniles a gran

escala es fundamental que además de una buena inducción a la metamorfosis, ésta se lleve a cabo completamente y de manera sincrónica, para que se obtengan el mayor número de juveniles posibles.

El tiempo de exposición de las larvas al inductor fue determinante en la sobrevivencia a su estadio poslarval principalmente a altas concentraciones. Puesto que fue evidente que la sobrevivencia de las larvas que estuvieron expuestas a estos compuestos a una concentración de 10^{-1} M durante 24 horas (figs. 4 y 5) tuvieron una sobrevivencia muy inferior a las larvas que estuvieron expuestas por un tiempo de tres horas (fig. 7). En los tres casos donde se expusieron por 24 horas, se presentó un inicio de metamorfosis, ya que en todas las muestras que se evaluaron a las 72 horas después ya tenían forma de poslarvas cuando murieron. Lo anterior indica que si bien se inició la metamorfosis, la alta concentración del inductor impidió de alguna manera que ésta llegara a su término. Una respuesta igual se presentó para el equinodermo *Echinarachnius parma*, cuando se utilizó KCl en concentración de 10^{-3} y 8×10^{-2} M expuesto durante 24 horas también resultó tener un efecto tóxico para las larvas y causó la mortalidad del 100% (Pearce y Scheibling, 1994). En el presente trabajo cuando el tiempo de exposición de la larva al inductor se redujo, la mortalidad poslarval disminuyó, y se obtuvieron valores de metamorfosis del 87% y 92% para KCl y GABA respectivamente 72 horas después de la inducción (fig. 7). Con lo expuesto anteriormente se mostró que el tiempo de exposición de la larva a algunos inductores en altas concentraciones es vital cuando se trata de obtener porcentajes de metamorfosis y sobrevivencia costeadables. Esto indica que la larva del erizo rojo se ve afectada directamente cuando es expuesta por tiempos prolongados a concentraciones altas de inductores químicos. Sin embargo algunas especies pueden ser favorecidas por esta concentración, tal es el caso del erizo *Strongylocentrotus droebachiensis* cuando se utilizó GABA para inducir a la

metamorfosis a concentración de 10^{-1} M expuesta por 24 horas, no mostró ser afectado por el inductor, y se obtuvo una metamorfosis del 70%. A esta concentración las poslarvas fueron normales y activas después de dos semanas a partir de la inducción (Pearce y Scheibling, 1990). Por lo tanto el tiempo de exposición es un factor importante para la sobrevivencia de los organismos y debe considerarse cuando se utilicen inductores químicos aplicados en acuicultura. En trabajos posteriores con larvas de erizo rojo deberá manipularse el tiempo de exposición, ya que es conveniente saber si en menor tiempo de exposición se tienen resultados similares.

Varios estudios concuerdan que la utilización de inductores químicos para inducir la metamorfosis en invertebrados marinos, no representa ser una desventaja en comparación a inductores naturales tales como macroalgas, placas microbianas (Pearce y Sscheibling, 1991), diatomeas bentónicas (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1992; Rogers-Bennett, *et al.*, 1994), algas coralinas incrustantes (Pearce y Scheibling, 1990; Kitamura, *et al.*, 1994), así como también el hábitat de los adultos (Kato y Schroeter, 1985; Pfister y Bradbury, 1996), el mucus que segregan algunos moluscos (Grant, 1981), entre otros.

Los porcentajes de metamorfosis obtenidos con diatomeas bentónicas y el control negativo, fueron ligeramente inferiores a la mayoría de los tratamientos con inductores químicos utilizados sin presentarse diferencias significativas ($p > 0.05$). A diferencia de lo que se esperaba el control positivo proporcionó valores de metamorfosis inferiores ($p = 0.0154$) al control negativo, lo que pudo deberse al origen del cultivo de las diatomeas, su estadio de madurez, la especie o especies que componen el cultivo y las bacterias asociadas que pudieron ser determinantes para que afecten la respuesta a la metamorfosis en las larvas (Salas-Garza, 1995). La película de bacterias puede influir en el asentamiento de las larvas de invertebrados de diferentes maneras;

al crear micro condiciones por cambios de pH (Mitchell y Young, 1972) o la síntesis de varios compuestos que pueden inducir a la metamorfosis y que solo pueden ser producidos por bacterias muy específicas. En el caso de las diatomeas bentónicas, estas se encuentran asociadas a cianobacterias, las cuales producen ficobiliproteínas, y se sugiere que los inductores pueden de alguna manera estar relacionados con la síntesis, función o degradación de las ficobiliproteínas, y sus precursores o productos de degradación (Morse, *et al.*, 1979b; Morse y Morse, 1984).

En la literatura disponible no se encontraron antecedentes de inductores químicos a la metamorfosis utilizados en la larva del erizo rojo, pero sí con diatomeas bentónicas. Sin embargo se señala que con las diatomeas bentónicas se presentaron elevadas tasas de mortalidad, debido a que las poslarvas presentaron una membrana de color negro-rojizo que impedía que la mandíbula estuviera funcional y por lo tanto que la poslarva se alimentara (Rogers-Bennett *et al.*, 1994). En el presente trabajo, la mortalidad en las unidades experimentales donde se utilizaron las diatomeas, se debió a la presencia de protozoarios, provenientes seguramente, del lugar donde se colectaron las diatomeas. Es importante señalar que en este estudio el promedio general de sobrevivencia final fue del 27% y las poslarvas desarrollaron una mandíbula funcional en un plazo de 27 días, mientras que en el estudio en comparación de Rogers-Bennett *et al.*, la metamorfosis se prolongó hasta 80 días.

6.2 Sobrevivencia de juveniles

Como se mencionó anteriormente la sobrevivencia de poslarvas resultante del uso de GABA y L-glutamina a la mayor concentración utilizada de

10^{-1} M y por 24 horas de exposición fue nula debido a efectos de toxicidad. Lo mismo ocurrió con el KCl, aunque en este caso la sobrevivencia fue del 21%.

En el segundo experimento, sólo se le dió seguimiento a los tratamientos de KCl y GABA, debido a que en los tratamientos con L-glutamina y diatomeas bentónicas, la presencia de protozoarios provocó una mortalidad cercana al 100%. No se pudieron apreciar diferencias significativas ($p < 0.05$) en la sobrevivencia de juveniles entre las concentraciones de los tratamientos de KCl y GABA (tablas III y IV, ver anexo). Destaca el hecho de que en el momento de la inducción a la metamorfosis, se observó un mayor número de larvas que inician la metamorfosis en relación directa a la concentración del inductor. El número de poslarvas obtenido al término de la metamorfosis, al paso del tiempo se va igualando en todos los tratamientos independientemente del número de larvas que inició la metamorfosis. Esta situación concuerda con lo encontrado por Salas-Garza (1995), en un estudio realizado con larvas de abulón. Este autor reporta una metamorfosis de más del 90% utilizando GABA y con diatomeas bentónicas por debajo del 40%. Por lo tanto se esperaría más del doble de poslarvas y juveniles obtenidos con GABA. Sin embargo, obtuvo mortalidades superiores al 50% con GABA, por lo que la diferencia en la sobrevivencia de juveniles entre el GABA y las diatomeas bentónicas se redujo.

En diferentes trabajos los investigadores coinciden que el cambio de la vida larval a la vida bentónica es el elemento que más influye en la mortalidad de las poslarvas es en su interacción con microalgas bentónicas, las cuales serán su primer alimento, como es el caso del abulón, y el erizo ya que tienen hábitat y dieta muy similar (Imai, 1967; Seki, 1980; Ebert y Houk, 1984; Garland y Cooke, 1985; McBride, 1990). También es conocido que las bacterias asociadas a la película de microalgas provocan infecciones y muerte a los juveniles (Scheltema, 1974).

Las poslarvas de los tratamientos denominados como "no manejo", presentaron una sobrevivencia similar a los que si se manejaron a pesar de que el manejo fue intenso. Por lo anterior se descartó que el manejo de los organismos al momento de las evaluaciones sea una causa importante de mortalidad, lo cual indica que la larva es resistente al movimiento, ya que no se observó que estuviera maltratada, ni tuvieron de brazos rotos, ni tampoco presentaron cambios de comportamiento por causa de estrés.

6.3 Desarrollo de las mandíbulas

En la metamorfosis del erizo se llevan a cabo cambios tanto morfológicos como fisiológicos. Los morfológicos pueden durar un tiempo aproximado de pocos minutos a unas cuantas horas y se pueden observar directamente a través de un microscopio compuesto. Pero los cambios fisiológicos implican un mayor tiempo que va desde cinco hasta 80 días, en el caso del erizo rojo (Hinegardner, 1969) (Rogers-Bennett, *et al.*, 1994). Después de los primeros días del inicio de la metamorfosis, los cambios no son tan evidentes y sólo se manifiestan de manera indirecta. En el sistema digestivo del erizo, los cambios terminan cuando la boca y el ano se abren, por lo tanto el erizo empieza a comer y a defecar y de este modo se pone fin al proceso de metamorfosis (Hinegardner, 1969). Las poslarvas de erizo rojo, empezaron a mostrar una mandíbula funcional siete días después de la inducción, aunque las evaluaciones se hicieron a partir del día 17, a diferencia de lo reportado por Rogers-Bennett *et al.* (1994) que examinaron poslarvas de erizo rojo y observaron que el 90% de los organismos no presentaban mandíbula, sino una membrana peristomal que cubría a ésta y le impedía ser funcional. Estos

autores señalan que fué hasta los 80 días posteriores a la metamorfosis que se dió la emersión de la mandíbula.

Después de 27 días de la inducción a la metamorfosis casi el 100% de los juveniles de los tratamientos evaluados ya presentaban una mandíbula funcional y se alimentaban de las diatomeas bentónicas que les fueron suministradas como alimento, confirmándose con los rastros que dejaron en el fondo de los frascos. En todas las concentraciones utilizadas con GABA se observó una mayor sincronización de la emersión de la mandíbula, ya que para los 27 días el 100% de las poslarvas presentaron mandíbula funcional (fig. 9). A diferencia de KCL, en los cuales se observa que no en todos alcanzó el 100% (fig.9). Por lo tanto se puede esperar que con la utilización de GABA como inductor, se obtendrán poslarvas con mandíbula funcional, lo cual puede resultar benéfico en un cultivo, donde se requiere una sincronización en el crecimiento de los juveniles.

La utilización de inductores químicos en la metamorfosis de invertebrados marinos, busca principalmente, proveer un estímulo directo a las larvas competentes, para promover una sincronización en el proceso de metamorfosis y en la culminación de ésta con un mayor número de juveniles. La mayoría de los autores no reporta un seguimiento hasta el término de la metamorfosis donde se pueda comparar la sobrevivencia de los juveniles con diferentes inductores, lo cual es de importancia, ya que un inductor químico que active la metamorfosis, no garantiza juveniles saludables ni la sobrevivencia de los mismos, como se demostró en este trabajo. Por lo tanto estos resultados no concuerdan con lo señalado por Morse (1979b), el cual determina que con un inductor adecuado se incrementan las tasas de metamorfosis, se obtiene un desarrollo más rápido y mejora la sobrevivencia de la poslarva. La mortalidad de las poslarvas puede ser consecuencia de varios factores (la efectividad del

inductor y el momento de la inducción, el compuesto, la concentración y el tiempo de exposición) de manera que sólo algunas poslarvas logran completar el proceso de metamorfosis y el resto muere. (Morse, *et al.* 1979).

7- CONCLUSIONES

- La larva del erizo rojo respondió a los inductores utilizados, probando que no es específica de un inductor en particular.
- La metamorfosis de las larvas tuvo una relación directa con la concentración del inductor.
- La sobrevivencia de los juveniles estuvo influenciada por factores externos mas que por la concentración y el inductor al que estuvieron expuestas, aunque el tiempo de exposición fue determinante en los primeros momentos de la metamorfosis.
- Las poslarvas presentaron mandíbulas funcionales en todos los tratamientos de KCl y GABA. No se observaron malformaciones en los juveniles a causa del inductor.

8- LITERATURA CITADA

- Allen, R. K. 1980. Common intertidal invertebrates of Southern California. USA. 316 p.
- Arredondo-Gómez, F. 1994. La microempresa pesquera en Baja California. *Paradigmas*. 5:33-42.
- Baloun, A. ; Morse, D. E. 1984. Ionic control of metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biol. Bull.* 167-138.
- Brandon, J.L. and Rockop, F.J. 1985. Life between tides. American Southwestern Publishing Co. of San Diego, USA. 228 p.
- Burke, R.D. 1980. Podial sensory receptors and the induction of metamorfosis in echinoids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 47:223-234.
- Burke, R. D. 1983a. Neural control of metamorfosis in *Dendraster excentricus*. *Biol. Bull.* 164:176-188.
- Bustos, R. E. Godoy, C., Olave, S., Troncoso, R. 1991. Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblamiento de recursos bentónicos, Parte 1. Investigaciones en el erizo chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782). Instituto de fomento pesquero, Chile. PNUD. Impresos XIMPAUSER. 1-60 pp.
- Cameron, R. A. and Hinegardner, R. T. 1974. Initiation on metamorphosis in laboratory cultured sea urchins. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass)*. 146:335-342.
- Cameron, R. A. and Schroeter. 1980. Sea urchin recruitment: effect of sustrate selection on juvenile distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 3:243-247.
- Cameron, R. A., Tosteson, T. R. and Hensley, V. 1989. The control of sea urchin metamorphosis: ionics effects. *Develop. Growth. Differ.* 31:589-594.
- Carpizo-Ituarte, E. J. 1994. Efecto de la L-tiroxina y compuestos neuroactivos en la inducción a la metamorfosis de dos especies de gasterópodos. Tesis Maestría, FCM-UABC. 82 pp.

- Chase, D. G. 1967. Inhibition of the cortical reaction with high hydrostatic pressure and its effects on the fertilization and early development of sea urchin eggs. Ph. D. Diss. Univ. of Washington, Seattle.
- Chia, F. and Burke, R.D. 1977. Echinoderm metamorphosis: Fate of larva structures. Symposium on Settlement and Metamorphosis of Marine Invertebrate Larvae, American Zoological Society Meeting. 219-234.
- Davis, M., Heyman, W. D., Harvey, W and Withstandley, C. S. 1990. A comparison of two inducers, KCl and *Laurencia* extracts and techniques for commercial scale induction of metamorphosis in the queen conch *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 larvae. J. Shellf. Res. 9(1):67-73.
- Doyle, R. W. 1974. Choosing between darkness and light: the ecological genetics of photic behaviour in the planktonic larvae of *Spirobis borealis*. Mar. Biol. 25:311-317.
- Ebert, E. and Houk, J. 1984. Elements and innovation in the cultivation of the abalone *H. rufescens*. Aquaculture 39:375-392.
- Epel, D. 1978. Mechanims of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. Curr. Topics Dev. Biol. 12:185-246.
- Eyster, L. S. and Pechenik, J. A. 1988. Comparison of growth, respiration, and feeding of juvenile *Crepidula fornicata* (L.) following natural or KCl-triggered metamorphosis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 118:269-279.
- Farias-Sánchez, J.A. 1980. Observaciones preliminares de una población de erizos "*Strongylocentrotus franciscanus*" (Echinodermata, Echinoidea) en Baja California. Tesis Licenciatura. ESCM-UABC. 94 p.
- Garland, D. C. and Cooke, L. S. 1985. Ingestion of bacteria on and the cuticle of crustose (non-articulated) coralline algae by post larval and juvenile abalone (*Haliotis ruber* Leach) from Tasmanian waters. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 91:137-149.
- Grant, J. F. 1891. Abalone culture in Japan: development and current commercial practice. Tas. Fish. Res. 23:1-17.
- Hadfield, M. G. 1977. Chemical interaction in larvae setting of a marine gastropod. In D. J. Faulker and W. H. Fenical (Ed). Marine Natural Products Chemistry. 403-414. Plenum, New York.

- Harvey, E. V. 1956. The american *Arbacia* and other sea urchins. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Hinegardner, R. T. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.* 137:465-475.
- Hubbard, E. J. A. 1988. Larval growth and induction of metamorphosis of a tropical sponge-eating nudibranch. *J. Moll. Estud.* 54:259-269.
- Imai, T. 1967. Mass production of molluscs by means of rearing the larvae in tanks. *Venus* 25 (3 y 4):159-167.
- Kato, S. and Schroeter, S. C. 1985. Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California. *Marine Fisheries Review.* 47(3):1-20.
- Kempf, S. C. and Willows, A. O. B. 1977. Laboratory culture of the nudibranch *Tritonia diomedea* (Tritoniidae: Opisthobranchial) and some aspects of its behavioral development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 30:261-276.
- Kitamura, H., Kitahara, S., Koh, H. B. 1994. Induction of larval settlement and metamorphosis in the sea urchins *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardis crassispina* by fatty acids. *Fisheries Science* 60(3):311-313.
- Lynch, W.F. 1949. Acceleration and retardation of the onset of metamorphosis in two species of *Bugula* from the Woods Hole region. *J. Exp. Zool.* 111:27-53.
- Manahan, D. T. 1983. The uptake and metabolism of dissolved aminoacids by bivalve larvae. *Biol. Bull.* 164:236-250.
- Malagrino-Lumare, G. 1972. Extracción y preservación de la gónada de erizo. Tesis Licenciatura. FCM-UABC. 79 pp.
- Martínez-López, R. E. 1994. Descripción del desarrollo larvario en el erizo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinoidea: Echinodermata), y Efectos en la densidad, ración alimenticia y cambios de agua. Tesis Licenciatura. FCM-UABC 52 pp.
- McBride, C. S. 1990. The relative effects of diet and irradiance on the growth and survival of postlarval red abalone *Haliotis rufecens*. M. Sc. Thesis. Dept. of Biology. San Jose State University, 45 pp.

- Mitchell, R. and Young, L. 1972. The role of microorganisms in marine fouling. Off. Nav. Res. Contract. U. S. Office of Naval Research Washington. D. C. 23 pp.
- Montgomery, D. C. 1983. Design and analysis of experiments. 418 pp.
- Morse, A. N. C. and Morse, D. E. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 75:191-215.
- Morse, D. E. and Morse A. N. C. 1993. Marine biotechnology: Control of larval metamorphosis. Biotechnology. Tien, W. *et al.* 206-219.
- Morse, D. E. 1984. Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. Aquaculture, 39:263-282.
- Morse, D. E. 1985. Neurotransmitter-Mimetic inducers of larval settlement and metamorphosis. Bull. Mar. Sci. 37(2):697-706.
- Morse, D. E., Hodder, N., Duncan, H., and Jensen, L. 1979. Gama-aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis. Science 204:407-410
- Morse, D. E., Hodder, N., Duncan, H., and Jensen, L. 1979b. Gamma-aminobutyric acid, a neurotransmitter induces planktonic larvae to settle and begin metamorphosis. Science (204). 407-410 pp.
- Morse, D. E., Duncan, H., Hooker, N., Baloun, A., Young, G. 1980. GABA induces behavioral and developmental metamorphosis in planktonic molluscan larvae. Federation Proceedings, 39(14):3237-3241
- Mottet, M. G. 1976. The Fishery Biology of Sea Urchins in the Family Strongylocentrotidae. Technical Report No. 20, Washington Department of Fisheries, Olympia, WA 66 p.
- Naidenko, T. Kh. 1996. Induction of metamorphosis of two species of sea urchin from sea of Japan. Mar. Biol. 126:658-692.
- Nell, J. A. and Holliday, J. E. 1986. Effect of potassium and copper on the settling rate of Sidney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) larvae. Aquaculture, 58:263-267.

- Palleiro-Nayar, J. S.; Aguilar, Montero, D.; Montaña-Moctezuma, G.; Romero-Martínez, J. M. 1994. Pesquería del erizo rojo en B. C. Temporada 92-93. En "Memorias del X Simposium Internacional de Biología Marina", 13-17 de Junio 1994. Ensenada, Baja California. México. Universidad Autónoma de Baja California, Southern California Marine Institute y Universidad Autónoma de Baja California Sur. 105 (A).
- Palleiro-Nayar, J. S., Lelevier-Grijalva, A., Navarrete-Gutierrez, M., Romero-Martínez, J. 1988. Biología del erizo rojo, *S. franciscanus* y su pesquería en Baja California. En Los Recursos Pesqueros. Secretaría de Pesca. 53-74.
- Parker, D. and Kalvass, P. 1992. Sea Urchins. In California's Living Marine Resources and their utilization, (Ed) W. L. Leet, C. M. Dewees, and C. W. Haugen, pp 41-43. Sea Grant Extension Publication UCSGEP-91-12, Sea Grant Extension Program, Wildlife and Fisheries Biology Department, University of California, Davis, CA.
- Pearce, C. M. and Scheibling, R. E. 1990. Induction of settlement and metamorphosis in the sand dollar *Echinarachnius parma*: evidence for an adult-associated factor. Mar. Biol. 107:363-369.
- Pearce, C. M. and Scheibling, R. E. 1990. Induction of metamorphosis of larvae of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, by coralline red algae. Biol. Bull. 179:304-311.
- Pearce, C. M. and Scheibling, R. E. 1991. Effect of macroalgae, microbial films, and conspecifics on the induction of metamorphosis of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 147:147-162.
- Pearce, C.M. and Scheibling, R. E. 1994. Induction of metamorphosis of larval echinoids ("*Strongylocentrotus droebachiensis*" and "*Echinarachinus parma*") by potassium chloride KCl. Inv. Rep. and Dev. 26(3):213-220.
- Pechenick, J. A. and Heyman, W. D. 1987. Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 112:27-38.
- Perron, F. E. and Turner, R. D. 1977. Development, metamorphosis and natural history of the nudibranch *Doriella obscura* (Corambiidae:Opisthobranchia), J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 27:171-185.

- Pfister, C.A. and Bradbury, A. 1996. Harvesting red sea urchins: Recent effects and future predictions. *Ecological Applications* 6(1):298-310.
- Ricketts, E. F. and Calvin, J. 1968. *Between Pacific Tides*. Standford University Press. 614 pp.
- Rogers-Bennett, L., Fasteneau, H.C., Hibbard-Robbins, T., Kain, Z. and Dewees, C.M. 1994. Culturing red sea urchins for experimental outplanting in Northern California. Final report. 15 pp.
- Rowley, R. J. 1989. Settlement and recruitment of sea urchins (*Strongylocentrotus* spp.) in a sea-urchin barren ground and a kelp bed: are populations regulated by settlement or post-settlement processes? *Mar. Biol.* 100:485-494.
- Salas-Filsinger, A. 1997. Efectos de la densidad, periodicidad en el suministro de alimento y ración alimenticia en un cultivo piloto comercial de larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis Licenciatura. FCM-UABC. 38 pp.
- Salas-Garza, A.E. 1995. Producción de juveniles de erizo "*Strongylocentrotus franciscanus*". Primer informe del proyecto. Financiamiento SEMARNAP.
- Salas-Garza, A.E. y Searcy-Bernal, R. 1992. Development and present status of abalone culture in México. pp 538-547. En *Abalone of the World; Biology, Fisheries and Culture*. Eds by S. a. Shephered, M. J. Tegner and S. A. Guzmán del Prío.
- Scheltema, R. S. 1974. Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. *Thalassia Jugosl.* 110:263-296.
- Searcy-Bernal, R. y Salas-Garza, A. E. 1990. Investigación sobre cultivo de abulón en la Universidad Autónoma de Baja California, México. *Ser. Cient. Universidad Autónoma de Baja California Sur.* 1(1):44-50.
- Segovia-Mattos, E. 1994. Evaluación de bioinductores de asentamiento y metamorfosis en larvas del erizo rojo "*Loxechinus albus*" (Molina, 1782). VII COLACMAR Congreso Latino-Americano sobre Ciencias do mar. 430-431 pp.
- Seki, T. 1980. An advanced biological engineering system for abalone seed production. p. 45-53, in *International Symposium on Coastal Pacific Marine Life*. Office of Sea Grant, Bellingham, Washington, 45 pp.

- Spindler, K. D. and Müller, W. A. 1972. Induction of metamorphosis by bacteria and by lithium-pulse in the larvae of *Hydractinia echinata* (hydrozoa). *Wilhelm Roux's Arch.* 169:271-280.
- Strathmann, M. F. 1987. "Phylum Echinodermata, Class Echinoidea", en *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press. Seattle, Washington. 670 pp.
- Stricker, S. A. 1989. Settlement and metamorphosis. *Bull. Mar. Sci.* 45:387-405.
- Tan, S.H. and Wong, T.M. 1995. Induction of settlement and metamorphosis in the tropical oyster, *Crassostrea belcheri* (Sowerby), by neuroactive compounds. *J. Shell. Res.* 14(2):435-438.
- Tegner, M.J. 1989. The feasibility of enhancing red sea urchin. "*Strongylocentrotus franciscanus*", stocks in California: An analysis of the options. *Mar. Fish. Rev.* 51(2):1-22.
- Tegner, M.J. and Dayton, P.K. 1977. Sea urchin recruitment pattern and implications of commercial fishing. *Science* 196:324-326.
- Tamashiro, E.; Fujita, Y.; Sakata, K. 1993. Induction of larval metamorphosis of *Trochus niloticus* by gamma-aminobutyric acid and a coralline red algal extract. *Nippon-Suisan-Gakkaishi-Bull.-Jap.-Soc.-Sci.Fish.* 59(7):1261.
- Wendt, D.E. 1996. Effect of larval swimming duration on success of metamorphosis and size of the ancestrular lophophore in *Bugula neritina* (Bryozoa). *Biol Bull.* 191:224-233.
- Wendt, D.E. and Woollacott, R. M. 1995. Induction of larval settlement by KCl in three species of *Bugula* (Bryozoa). *Invertebrate Biology* 114(14):345-351.
- Williams, G. B. 1969. The effect of *Fucus serratus* in promoting the settlement of larvae of *Spirobis borealis*, Poliqueta. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 44:397-414.
- Woollacott, R. M. and Hadfield, M. G. 1996. Induction of metamorphosis in larvae of a sponge. *Invertebr. Biol.* 115(4):257-262.

- Yazaki, I. 1995. Quantitative analysis of metamorphosis induced by L-glutamine in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zoological Science* 12:105-112.
- Yazaki, I. and Harashima, H. 1994. Induction of metamorphosis in the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*, using L-glutamine. *Zoological Science* 11:253-260.
- Yool, A. J., Grau, S. M., Hadfield, M. G., Jensen, R. A. Markell, D. A. and Morse, D. E. 1986. Excess potassium induce larval metamorphosis in four marine invertebrate species. *Biol. Bull.* 170:255-266.
- Zúñiga-Cortes, A. 1994. Desove, Fertilización y desarrollo larval en el erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. *Memorias del Servicio Social. FCM-UABC*. 25 pp.

Tabla I.— ANDEVA de dos vías del experimento de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo rojo con diferentes inductores (KCl, GABA, L-glutamina) a diferentes concentraciones (10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-10} M). ($\alpha = 0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
Inductor	2	244.222	122.111	12.166
Concentración	2	219.556	109.778	10.937
Interacción	4	542.222	135.556	13.506
Residual	18	180.667	10.037	
Total	26	1186.667	45.641	

Tabla II.— Prueba de contrastes de Tukey del experimento de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo rojo con diferentes inductores (KCl, GABA, L-glutamina) a diferentes concentraciones (10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-10} M). Solo se muestran los tratamientos que fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$)

TUKEY	P
KCl 10^{-1} Vs KCl 10^{-5}	0.0112
KCl 10^{-1} Vs KCl 10^{-10}	0.0001
KCl 10^{-5} Vs KCl 10^{-10}	0.0039
KCl 10^{-1} Vs Blanco	0.0005
KCl 10^{-1} Vs Diat. Bent	0.0229
KCl 10^{-10} Vs Diat. Bent	0.0012
GABA 10^{-1} Vs GABA 10^{-10}	0.0180
GABA 10^{-10} Vs Diat. Bent.	0.0229
L-glu 10^{-5} Vs L-glu 10^{-10}	0.0275
L-glu 10^{-1} Vs Diat. Bent	0.0144
L-glu 10^{-5} Vs Diat. Bent	0.0034

Tabla III.- ANDEVA de una vía, de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con KCl (concentraciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} M) y el control positivo y negativo, 24 horas pos-inducción. ($\alpha = 0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Entre Tratamientos	3	61.667	20.556	0.553
Residual	8	297.333	37.167	
Total	11	359.000		

Tabla IV.- ANDEVA de una vía, de los datos de metamorfosis obtenidos de la inducción con GABA (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-10} M) y el control positivo y negativo, 24 horas pos-inducción. ($\alpha = 0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Entre Tratamientos	3	164.917	54.972	4.815
Residual	8	91.333	11.417	
Total	11	256.250		

Tabla V. – ANDEVA de una vía de la sobrevivencia de las poslarvas después de haber inducido a la metamorfosis con KCl a diferentes concentraciones. ($\alpha = 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F
Entre Tratamientos	15	9440.333	629.356	1.085
Residual	32	18562.667	580.083	
Total	47	28003.000		