

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTOS DE LA EPINEFRINA, NOREPINEFRINA Y EL L-DOPA
EN EL ASENTAMIENTO Y LA METAMORFOSIS DE
LARVAS DE Crassostrea gigas.

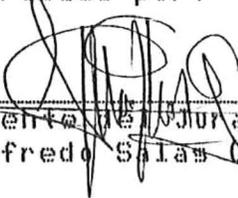
TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O.
PRESENTA
HEBERTO CAVAZOS LLITERAS

ENSENADA B.C., NOVIEMBRE 15 DE 1987.

EFFECTOS DE LA EPINEFRINA, NOREPINEFRINA Y EL L-DOPA
EN EL ASENTAMIENTO Y METAMORFOSIS DE LAS
LARVAS DE Crassostrea gigas.

TESIS
QUE PRESENTA
HEBERTO CAVAZOS LLITERAS

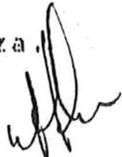
Aprobada por:



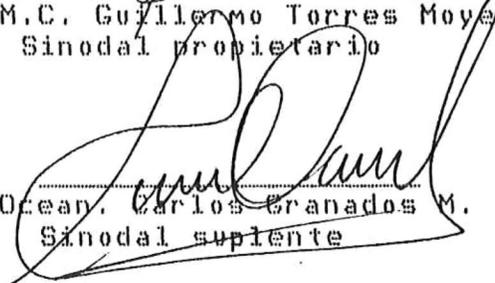
Presidente del Jurado
Ocean. Alfredo Salas Garza.



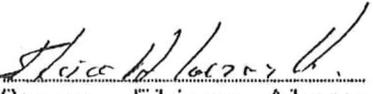
M.C. Guillermo Torres Moya
Sinodal propietario



M.C. Francisco Ley Lou
Sinodal propietario



Ocean. Carlos Granados M.
Sinodal suplente



Ocean. Eliseo Almanza H.
Sinodal suplente

RESUMEN

Larvas de Crassostres gigas fueron tratadas con Epinefrina, Norepinefrina y L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), compuestos neuroactivos análogos estructuralmente, como inductores al asentamiento. Epinefrina y Norepinefrina probaron ser excelentes inductores para obtener semilla sin cementar a la concentración de $10E^{-3}$ M y un tiempo de exposición de 60 minutos, mientras que L-DOPA fue el compuesto con el que se obtuvo una mayor cantidad de semilla cementada, trabajando a una concentración de $10E^{-4}$ y un tiempo de exposición de 60 minutos.

A MIS PADRES
Gilda y Heberto

Por el respeto y apoyo con el que siempre
han tomado todas mis desiciones.

A MIS HERMANAS
Yolanda, Gilda, María del Carmen y Marcela

AGRADECIMIENTOS

A Luis McAnally Salas por ser quien sugirió el tema del presente trabajo y ayudarme a planear la forma de realizar los experimentos.

A Alfredo Salas Garza por aceptar ser el asesor de este trabajo durante el cual sus críticas fueron muy importantes para mejorar el trabajo y el escrito final.

A mis compañeros de laboratorio Saul Martín del Campo B. por la ayuda que me brindó para conseguir los reactivos necesarios y a Salvador Velázquez por asesorarme en la parte química del trabajo, además de cooperar durante todas las pruebas.

INDICE

1.0	INTRODUCCION	1
1.1	Antecedentes	3
1.2	Objetivo	7
2.0	MATERIALES Y METODOS	8
2.1	Obtención y cultivo de larvas	8
2.2	Selección de las larvas utilizadas	9
2.3	Diseño experimental	10
2.3.1	Evaluación del efecto de los inductores	14
2.3.2	Tratamiento estadístico	16
3.0	RESULTADOS	20
3.1	Inducción total	20
3.2	Inducción a semilla sin cementarse	28
3.3	Semilla cementada	32
4.0	DISCUSION	44
4.1	Inducción Total	44
4.2	Induccion a semilla sin cementar	46
4.3	Semilla cementada	49
5.0	CONCLUSIONES	53
	LITERATURA CITADA	55
6.0	APENDICE	58

LISTA DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Diseño factorial utilizado para cada compuesto, las X representan el número de réplicas por celda	13
II	Ordenamiento dado a los compuestos para el análisis de varianza de tres vías, donde las X representan los frascos utilizados por concentración y tiempo	18
III	Ordenamiento de los 19 grupos formados con la prueba "LSD" al 95% de confianza para el total del asentamiento.	21
IV	Resultados del análisis de varianza de tres vías para el total de asentamiento del experimento 1 y 2, donde *= $P < 0.01$, **= $P < 0.05 > 0.01$, ***= $P < 0.1 > 0.05$ NS=no significativo	23
V	Ordenamiento de los 18 grupos formados con la prueba "LSD" al 95% de confianza para semilla sin cementar	28
VI	Resultados del análisis de varianza de tres vías para semilla sin cementar del experimento 1 y 2, donde *= $P < 0.01$, **= $P < 0.05 > 0.01$, ***= $P < 0.1 > 0.05$ NS=no significativo.	31
VII	Ordenamiento de los 15 grupos formados con la prueba "LSD" al 95% de confianza para semilla cementada	35
VIII	Resultados del análisis de varianza de tres vías para semilla cementada del experimento 1 y 2, donde *= $P < 0.01$ **= $P < 0.05 > 0.01$, ***= $P < 0.1 > 0.05$, NS=no significativo	38

LISTA DE FIGURAS

FIG		PAGINA
1	Modelo diaframatico que representa el mecanismo de asentamiento y metamorfosis de larvas de ostión.....	11
2	Dibujo de una semilla de <u>C. gigas</u> que muestra el desarrollo de la discoconcha utilizada para diferenciarla de las larvas.....	15
3	Promedios de asentamiento que presentaron los 19 grupos diferenciados en el asentamiento total.....	22
4	Promedio general de cada compuesto para el total del asentamiento.....	25
5	Promedio de inducción para el total del asentamiento de cada concentración.....	26
6	Gráficas predictivas generadas con la técnica de superficies de respuesta, para el total del asentamiento.	27
7	Promedios de asentamiento que presentaron los 18 grupos diferenciados para semilla sin cementar.....	30
8	Promedio general de cada compuesto para la semilla sin cementarse.....	33
9	Promedio de inducción para semilla sin cementar a cada concentración.....	34
10	Gráficas predictivas generadas con la técnica de superficies de respuesta para semilla sin cementar.....	35
11	Promedios de asentamiento que presentaron los 15 grupos diferenciados para semilla cementada.....	38
12	Promedio general de cada compuesto para la semilla cementada.....	40
13	Promedio de inducción para semilla cementada a cada concentración.....	41
14	Gráficas predictivas generadas con la técnica de superficies de respuesta para semilla cementada.....	43

1.0 INTRODUCCION

La gran demanda que existe por productos marinos, ha provocado que la producción natural de algunas especies sea insuficiente. Este es el caso del ostión en Estados Unidos, en donde la sobreexplotación de los bancos naturales aunado a fenómenos ambientales y problemas de contaminación, han motivado una baja en la producción anual y por ende la escases del producto (Krantz,1982).

En México ésta situación, a ocasionado que el empleo de técnicas acuaculturales para la producción de ostión sea ya un negocio rentable en algunas zonas del país y que se perfile como una alternativa a corto y mediano plazo para la mayoría de las costas.

La creación de cooperativas pesqueras que dependan del cultivo de ostión ha demandado la formación de laboratorios de producción de semilla (ostrilla), que se utilizan en el cultivo. Las cuales en su mayoría, son criadas en sartas o canastas. "Estos métodos aseguran una producción constante y de ésta manera el aumento de la producción, además de permitir la recuperación de los bancos ostrícolas del lugar (Jaime,1974)".

Otra de las ventajas del cultivo de ostión mediante la utilización de semilla, es que la pesquería se puede desarrollar en lugares donde tradicionalmente no existía,

como es el caso de Baja California, donde no hay bancos de ostión de interés comercial, pero que debido a la ayuda de estas técnicas, es ya un hecho su explotación, pues al reunir sus aguas las características necesarias, los cultivos realizados han sido un éxito. Tal es el caso de la cooperativa Bahía Falsa que opera en San Quintín, B. C., entre otras.

En los laboratorios de producción de ostrilla, las etapas de operación, como son, producción de larva pediveliger, número de larvas que alcanzan la metamorfosis y sobrevivencia de la semilla, exhibe una gran variación y menor eficiencia de la que reporta la literatura científica, pero el punto donde se carece de una predicción de éxito, es la etapa de la metamorfosis, siendo este el mas frustrante fenómeno técnico encontrado hasta ahora (Krantz,1982).

"Nuestra capacidad para cultivar grandes cantidades de larvas en laboratorio, es un paso importante para estudios detallados del comportamiento larvario. De igual modo, nuestra capacidad para aumentar el atractivo a las superficies de fijación, es una arma importante para la producción a gran escala de semilla de ostión (Walne,1981)".

1.1 Antecedentes

Para tratar de controlar el fenómeno de la metamorfosis en larvas de moluscos, se han hecho investigaciones para determinar el factor responsable que regula este fenómeno de las larvas. Doyle (1974), encontró que la respuesta al asentamiento en muchas larvas de invertebrados marinos, está controlada por un número de factores intrínsecos y extrínsecos, como el hereditario, la edad de la larva (Hadfield, 1977), el historial de nutrición (Kempf y Willows, 1977; Perron y Turner, 1977) y características fisico-químicas existentes en el sustrato (Williams, 1969).

Walne en 1981, reporta algunas experiencias que se tuvieron en Conwy Inglaterra en 1938, en las que encontró accidentalmente, que unas conchas que se habían dejado en un tanque de larvas, llevaban una gran cantidad de semilla recién fijada y unas cuantas de mayor tamaño, mientras que las conchas semejantes que se habían limpiado todos los días, solo tenían unas pocas. Esto sugirió que las larvas próximas a la fijación, eran atraídas por la contaminación de las superficies inalteradas o la presencia de semilla más antigua.

El comportamiento gregario de las larvas, fue confirmado por Bayne (1969), al comparar que las densidades en la fijación sobre placas que habían recibido previamente

fijaciones, fué mayor que en las placas vírgenes. Crisp y Meadows (1962,1963), notaron en las larvas de cirripéridos, que la tendencia al gregarismo, se debía al reconocimiento de una proteína insoluble presente en el integumento de balanos, la forma de la artropodina esclerotizada, expuesta en la epicutícula. Una capa de esta proteína, de solo pocas moléculas, adsorbida sobre una superficie inerte es capaz de promover el asentamiento (Crisp,1965).

Las investigaciones mas recientes sobre el problema, se han enfocado sobre el potencial que presentan algunas sustancias químicas en el asentamiento de larvas de ostión, encontrando que algunos compuestos simples, actúan como el activador del asentamiento de algunas especies de invertebrados marinos (Cooper,1963).

La primera sustancia identificada fué colina (Bonar,1976), utilizada en forma de succinil colina. En opistobranquios, colina induce al asentamiento y la metamorfosis en un tiempo de 2-3 días. La segunda sustancia, es el ácido alfa-aminobutírico (GABA), el cual es un potente estímulo para la metamorfosis en Haliótidos (Morse et al.,1979). Un punto importante de estas sustancias, es el papel neuroactivo que tienen en muchos tipos de animales (Hadfield,1984). Experimentos con Crassostrea virginica y Crassostrea gigas muestran, que una

película de bacterias asociadas a juveniles de ostión, favorecen al asentamiento y la metamorfosis de las larvas, y que el L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) o los productos de su oxidación (e.g. pigmentos de melanina) aislados de cultivos de estas bacterias son tambien agentes activos (Weiner et al.,1985). L-DOPA y los pigmentos de melanina, son precursores de las catecolaminas (dopamina, norepinefrina, epinefrina y octopamina), las cuales tienen en comun, el actuar como neurotransmisores reguladores de efectos biológicos y metabolicos, como la excitabilidad (Buddecke,1983). La habilidad de estos compuestos neuroactivos y sus análogos estructurales, para inducir a la fijación y la metamorfosis, se probó tambien con éxito en otras especies de moluscos. Hadfield (1978) encontró, que tratando larvas de Pesilla sibogae con concentraciones de 10 elevado a la -3 Molar ($10E-3$ M) de bitartrato de adrenalina y con noradrenalina, el 50% de las larvas mostraban regresion del velum. Mientras que el acido alfa-aminobutírico (GABA), potente inductor en otros gastrópodos, presentaba una pobre actividad en esta especie, induciendo solo al 30% de las larvas en periodos de 2-3 días.

Coon et al.(1985), probaron el efecto de las catecolaminas y el L-DOPA, como inductor de asentamientos y metamorfosis de C. gigas, donde el tratamiento de las

larvas a concentraciones de $10E-4$ M de epinefrina obtuvieron una respuesta >90%, con norepinefrina >80% y con L-DOPA a concentraciones de $10E-5$ M solo del 20-50%, cuando en los testigos, los asentamientos no fueron mayores del 15%.

Cooper (1982), probó el potencial de aplicación del DOPA en sistemas comerciales de producción de semilla, encontrando que las fijaciones se presentaban después de 24 horas de la adición del compuesto, sin que las larvas mostraran preferencia por el tipo de sustrato, ya fuera concha madre ó la superficie de los frascos el experimento. Este fenómeno, tiene particular interés para los sistemas de producción, ya que el tipo de sustrato que se les proporciona a las larvas, es determinante para el porcentaje de semilla que se obtenga, por número de larvas que entran a fijación. Por lo que utilizar inductores que aseguren el asentamiento, para obtener ostrilla suelta o fija en el sustrato que mas convenga, disminuiría el trabajo de los laboratorios y repercutiría en los costos de producción.

1.2 Objetivo

Probar el efecto de la Norepinefrina (NE), Epinefrina (E), y L-DOPA en la fijación y metamorfosis de larvas de Crassostrea gigas, así como determinar el tiempo de exposición y la concentración a la que se obtienen los mejores resultados.

2.0 MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención y cultivo de larvas

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas I.I.O. de la Universidad Autónoma de Baja California U.A.B.C., donde el tipo de instalaciones y las técnicas utilizadas son las recomendadas para la producción comercial de semilla de C. gigas.

Las larvas de Crassostrea gigas, se obtuvieron por inducción al desove de 10 ejemplares adultos. Cultivandose con la metodología estándar utilizada por el Laboratorio de Moluscos del I.I.O. de la U.A.B.C. en tanques de fibra de vidrio de 1200 litros con cambios de agua cada tercer día y alimentandolas diariamente con una dieta de Isochrysis aff. galbana var. Taithiana y Monochrysis lutheri en proporción de 1:1 a una concentración de 30,000 células/mililitro, durante las dos primeras semanas y 50,000 células/mililitro, las últimas dos semanas.

Durante los cambios de agua, se tomaron muestras del cultivo, verificandose la sobrevivencia y el grado de desarrollo de las larvas.

2.2 Selección de las larvas utilizadas

El criterio que se siguió para la selección de las larvas utilizadas en este estudio, estuvo basado en la talla de éstas. Este método, es el utilizado por el Laboratorio de Moluscos del I.I.O., en donde las larvas que se retienen en un tamiz de 314 micras, son las que pasan a las cámaras de fijación, larvas que se encuentran en la etapa pediveliger con la mancha ocular bien desarrollada y una buena actividad en búsqueda de sustrato, este criterio difiere del utilizado por Coon et al.(1985,1986), ya que las larvas que utilizan ellos en sus estudios son seleccionadas en base a su desarrollo morfológico, mas que a su talla.

Los términos "asentamiento" y "metamorfosis" usados en este estudio, estan rigurosamente definidos por Sheltema(1974) y Burke(1983). Las fases de asentamiento y metamorfosis de C. gigas, sigue la progresión característica, descrita por Nelson (1924) para las especies de ostión.

La fase inicial del asentamiento, comienza cuando una larva nadadora extiende el pie hacia adelante y se deposita en el sustrato, en donde reptta en busca del lugar adecuado para su fijación o cementación. Si el sustrato encontrado por la larva no es el adecuado, tiene la capacidad de nadar

nuevamente y buscar un sitio mas propicio para este proceso. La fijación, ocurre cuando la larva encuentra el lugar adecuado para su desarrollo y se cementa o fija al sustrato(fig 1).

El término del periodo nadador, la subsecuente etapa donde la larva reptá por el sustrato y por último, su cementación, es lo que se denomina asentamiento. Previo a la cementación, el asentamiento es reversible. La transición morfogénica de larva a una morfología juvenil, que normalmente comienza con la cementación, es lo que se denomina metamorfosis, la cual es irreversible. Los juveniles de ostión destinados al cultivo se nombran semilla u ostrilla.

2.3 Diseño experimental

Se probó el efecto que tiene la epinefrina la norepinefrina y el L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa), en la fijación y metamorfosis de larvas de C. gigas, para lo que se ensayó con las concentraciones de $10E^{-3}$, $10E^{-4}$ y $10E^{-6}$ M, las cuales, estan alrededor de la concentración óptima de $10E^{-4}$ M propuesta por Coon et al. (1985). Además, para determinar el mejor tiempo de exposición a los compuestos, se probaron los tiempos de 20,40 y 60 minutos.

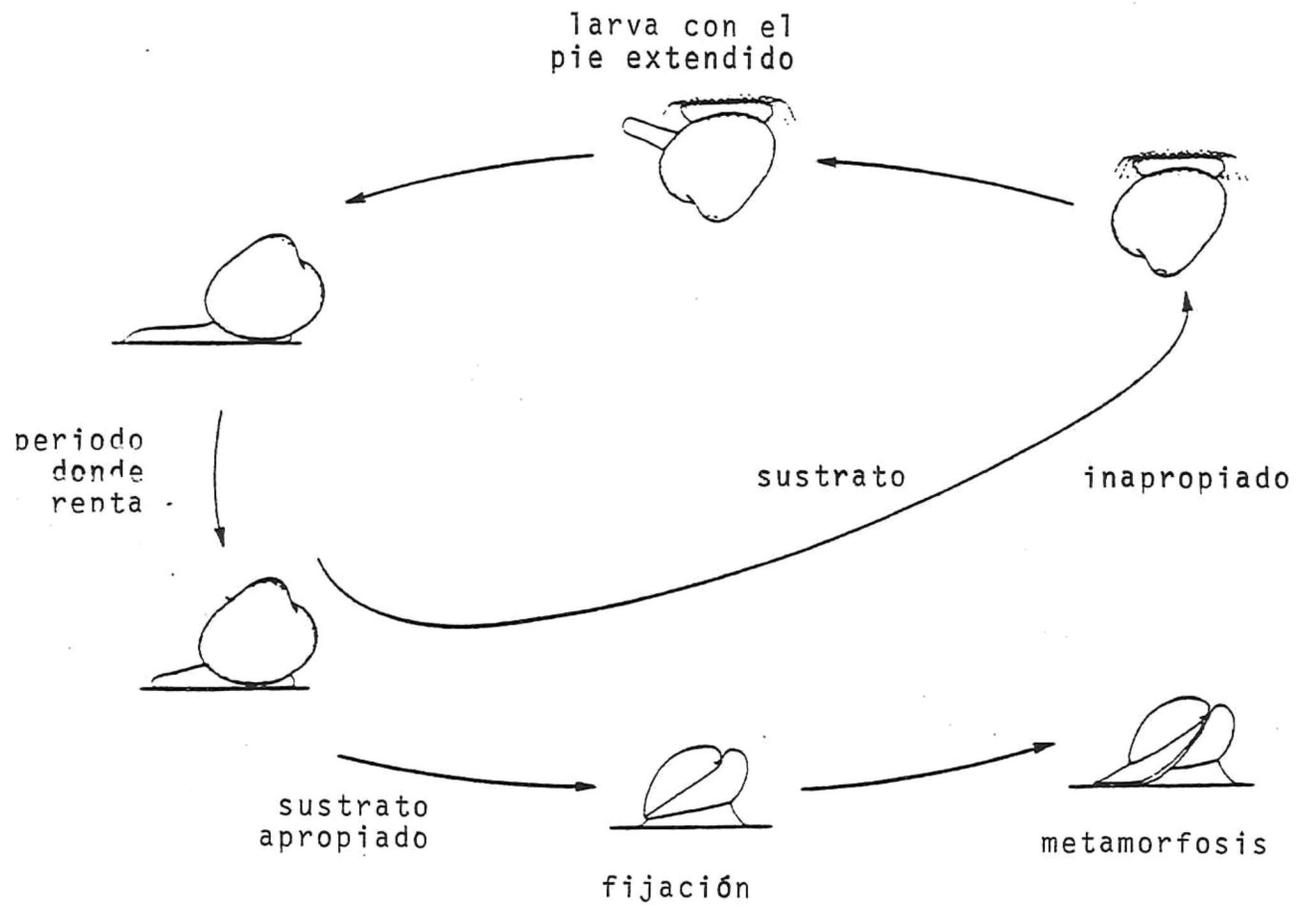


FIGURA 1: Modelo diagramatico que muestra el mecanismo de asentamiento y metamorfosis de ostion.

El agua de mar utilizada durante el desarrollo del estudio, fué filtrada a una micra y esterilizada por luz ultravioleta.

Todas las pruebas se corrieron por triplicado, y con tres testigos a los que no se añadió compuesto alguno, las que se realizaron en un volumen de 100 mililitros, en frascos de vidrio, con una densidad larval entre 0.72 y 1.33 larvas por mililitro. Coon et al. (1985), no reporta diferencias significativas de los resultados al utilizar densidades larvales dentro del rango de 0.5-150 larvas/ml.

Para estimar los efectos de las concentraciones y los tiempos de exposición, se diseñó un factorial de 3X3 para cada compuesto (tabla I).

Durante la prueba, los frascos tuvieron un ordenamiento aleatorio para eliminar el problema de las pseudoreplicas.

Las larvas no fueron alimentadas durante el experimento, para minimizar el efecto de un factor extraño con el que posiblemente pudieran contribuir las microalgas.

La prueba se llevó a cabo a temperatura ambiente, la cual estuvo en el rango de 20-22 grados centígrados.

Tabla 1: Diseño factorial utilizado para los tres compuestos donde las X representan el número de réplicas por celda.

		TIEMPO →		
		t1	t2	t3
C O M P U E S T O	conc1	xxx	xxx	xxx
	conc2	xxx	xxx	xxx
	conc3	xxx	xxx	xxx

Terminado el tiempo de exposición, se hacía el cambio de agua con la solución, por agua de mar sin ningún compuesto, y se dejaba por espacio de 48 horas tiempo suficiente para diferenciar visualmente las larvas que alcanzaron la metamorfosis de las que no, por el desarrollo de la discoconcha como indicador (fig.2).

Al finalizar las 48 horas, las larvas fueron fijadas con dos mililitros de formol al 5%, para posteriormente ser cuantificados los resultados.

Por los primeros resultados obtenidos en el experimento, se corrió nuevamente la prueba en un segundo experimento, en el que se redujeron los tiempos de exposición a 5, 10 y 15 minutos, además de sustituir la tercera concentración de $10E-6$ M por $10E-5$ M, utilizando la misma metodología que en el experimento 1.

2.3.1 Evaluación del efecto de los inductores

Se consideró semilla sin cementar, a toda aquella que presentó el desarrollo de la discoconcha, y además, se pudiera separar del frasco por un chorro fuerte de agua, o que se encontrara completamente suelta en el fondo. Semilla cementada, fue toda la que estaba adherida a los frascos.

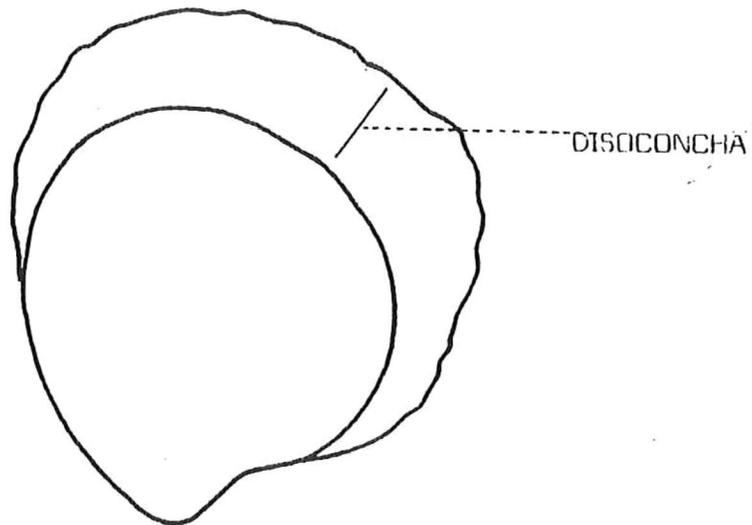
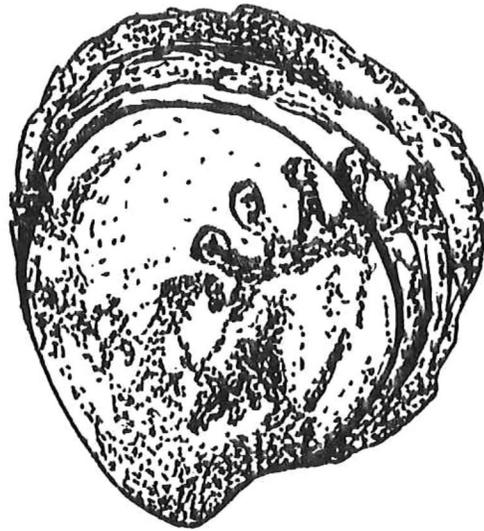


FIGURA 2: Dibujo de una semilla de *C. gigas* que muestra el desarrollo de la disoconcha utilizada para diferenciarla de las larvas.

El conteo de la semillas, se hizo concentrando por separado los diferentes tipos de ésta (suelta y fija), encontrada en cada frasco, en una cámara de conteo Sedwick-Rafter, para diferenciar con ayuda de un microscopio compuesto las que presentaran el desarrollo de la discoconcha.

2.3.2 Tratamiento estadístico

Se inició, convirtiendo los porcentajes de semilla suelta, fija y los totales de ambos, encontrados en cada frasco, a la función arcoseno de la raíz de P, transformación recomendada por Sokal y Rohlf (1969) cuando se trabaja con porcentajes, en donde P es igual a la proporción de 0-1 del porcentaje.

Los datos transformados, fueron los utilizados en las pruebas de homogeneidad de varianza y normalidad, requisitos previos para la utilización de las pruebas estadísticas empleadas.

La primera prueba que se aplicó a los datos, fue un análisis de varianza de una vía, para cada uno de los resultados (total, sin cementar y cementada) de los dos experimentos, y poder agrupar posteriormente con una prueba "a priori" (LSD: mínima diferencia significativa), formando

grupos de igual respuesta (Sokal y Rohlf, 1969; Nie et al., 1975). Además, se usó un anova de tres vías, para observar las interacciones entre los compuestos las concentraciones y los tiempos de exposición (tabla II).

Se utilizó también, la técnica de superficies de respuesta, para obtener gráficas predictivas de la metamorfosis, ajustando a la fórmula:

$$Z=B_1+B_2X+B_3Y+B_4(XX)+B_5(YY)+B_6(XY)$$

donde:

Z=Respuesta en porcentaje de la metamorfosis

B=Coficiente de la regresión

X=Concentración del compuesto

XX=Efecto cuadrático de la concentración

Y=Tiempo de exposición

YY=Efecto cuadrático del tiempo de exposición

XY=Efecto de interacción entre concentración y tiempo

Los coeficientes de la ecuación, fueron calculados con una regresión múltiple por pasos, igualando los niveles de F a cero (Lough, 1975), para aceptar o remover las variables. Además, el orden de inserción de las variables, se determinó utilizando el coeficiente de correlación parcial, como medida de la importancia de estas.

Tabla II: Ordenamiento dado a los compuestos para el análisis de varianza de tres vías, donde las X representan los frascos utilizados por concentración

TIEMPO →

			t1	t2	t3
COMPUESITO	1	CONC 1	X X X	X X X	X X X
		CONC 2	X X X	X X X	X X X
		CONC 3	X X X	X X X	X X X
	2	CONC 1	X X X	X X X	X X X
		CONC 2	X X X	X X X	X X X
		CONC 3	X X X	X X X	X X X
	3	CONC 1	X X X	X X X	X X X
		CONC 2	X X X	X X X	X X X
		CONC 3	X X X	X X X	X X X
AGUA DE MAR		X X X	X X X	X X X	

A partir de las ecuaciones resultantes, se generaron las gráficas de superficies de respuesta que muestran el efecto combinado de la concentración y el tiempo, sobre la respuesta en porcentaje de metamorfosis de las larvas.

6.0 RESULTADOS

3.1 Inducción total

Al utilizar la prueba LSD, se lograron diferenciar al 95% de confianza, 19 grupos de igual respuesta, para el total del asentamiento de los dos experimentos (tabla III). En donde el máximo asentamiento encontrado, representado por el grupo 1 fué de 84.83%. Grupo formado por la combinación de 60 minutos de exposición a la concentración de $10E-4$ de epinefrina y 40 minutos de exposición a la concentración de $10E-3$ de norepinefrina. Este resultado, es semejante solo para la epinefrina, según lo reportado por Coon et al. (1985). El grupo 19 el de menor respuesta (0.00%), está formado principalmente por la concentración de $10E-6$ M de los tres compuestos a cualquier tiempo de exposición y los testigos. La respuesta en asentamiento del resto de los grupos se muestra en la figura 3.

El análisis de varianza de tres vías (tabla IV), señala para los dos experimentos, diferencias significativas hasta del 99% de confianza, entre cada uno de los factores del experimento (compuesto, concentración y tiempo), así como entre las combinaciones de estos. A excepción en el experimento 1 del factor tiempo y en el

TABLA III: Ordenamiento de los 19 grupos formados con la prueba LSD al 95% de confianza para el total del asentamiento.

		TIEMPO (min) →					
		5	10	15	20	40	60
EPIINEFRINA [M]	-3	7	9	8	2	2	2
	-4	7	9	14	4	2	1
	-5	15	11	18			
	-6				19	19	19
NOR-EPIINEFRINA [M]	-3	4	5	5	2	1	2
	-4	10	13	17	12	4	2
	-5	18	19	17			
	-6				19	19	19
L-DOPA [M]	-3	12	16	19	3	6	7
	-4	17	15	19	5	4	12
	-5	17	13	17			
	-6				19	19	19
AGUA DE MAR		19	19	19	19	19	19

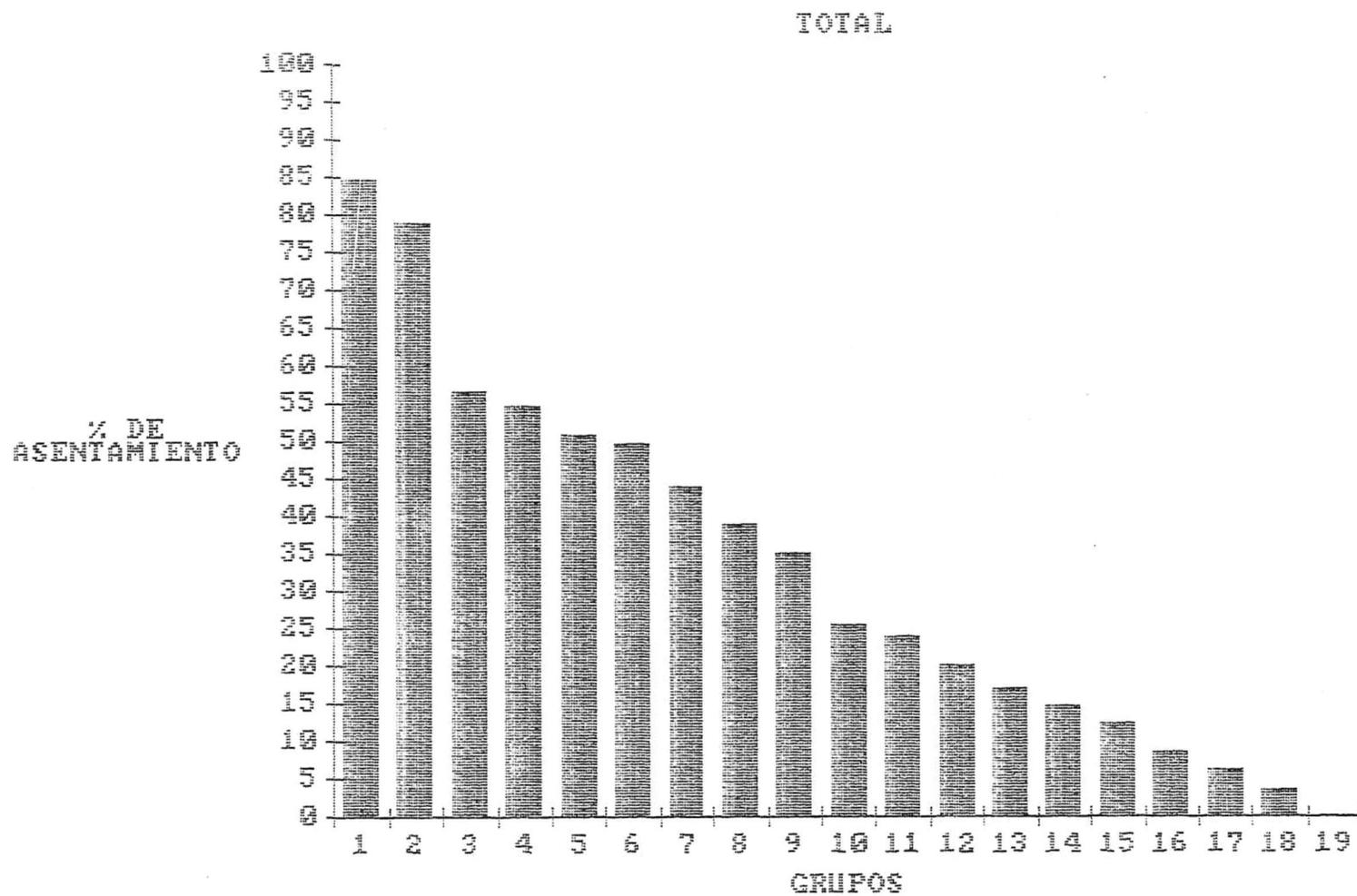


FIGURA 3: Promedios de asentamiento que presentaron los 19 grupos diferenciados en el asentamiento total.

TABLA IV: Resultados del analisis de varianza de tres vias para los totales del experimento 1 y el experimento 2. Donde *= $P<0.01$, **= $P<0.05>0.01$ ***= $P<0.1>0.05$, NS=no significativo.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	MEDIA DE CUADRADOS	F
COMPUESTO	28356.79	3	9452.262	*
CONCENTRACION	34536.5	2	17268.25	*
TIEMPO	89.99219	2	449961	**
COMP x CONC	13908.59	6	2318.099	*
COMP X TIEMPO	1404.203	6	234.0339	*
CONC X TIEMPO	564.5547	4	141.1387	*
COMP X CONC X TIEMPO	1108.258	12	92.35482	*
ERROR	926.4062	72	12.86675	

EXPERIMENTO 1

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	MEDIA DE CUADRADOS	F
COMPUESTO	15188.79	3	5002.956	*
CONCENTRACION	3287.317	2	1643.658	*
TIEMPO	846.8633	2	423.4317	*
COMP x CONC	4479.414	6	746.569	*
COMP X TIEMPO	691.2618	6	115.2103	*
CONC X TIEMPO	345.7735	4	86.44336	**
COMP X CONC X TIEMPO	967.1446	12	80.59	*
ERROR	1815.305	72	25.21257	

EXPERIMENTO 2

experimento 2 del efecto concentración X tiempo, en los que las diferencias entre éstos, se aceptaron al 95%.

La epinefrina, fué el compuesto con el mejor promedio general de inducción al asentamiento con el 34.62%, si se tomaban en cuenta todas las concentraciones y todos los tiempos de exposición, seguido de la norepinefrina con un 27.87% y el L-DOPA con el 16.3% (fig. 4).

La mejor concentración, fué la $10E^{-3}$, esto se dedujo, al promediar todos los tiempos de exposición, a cada una de las concentraciones, con promedio de 60% para epinefrina, 68.97% con norepinefrina y 28.79% L-DOPA (fig. 5).

De cada compuesto, se realizaron las gráficas de superficies de respuestas (fig. 6), corroborando de una manera gráfica, que la concentración del compuesto es el factor principal que regula el porcentaje de metamorfosis en el experimento 1, observando un gradiente ascendente de metamorfosis hacia las mayores concentraciones de los compuestos, y que las isolíneas corrían en posición paralela al eje del tiempo. En el experimento 2, el aumento de la significancia con la que se aceptan las diferencias entre los tiempos, se refleja en la curvatura que presentan las isolíneas de la figura 6. Las isolíneas de las gráficas, se hicieron tomando en cuenta el error

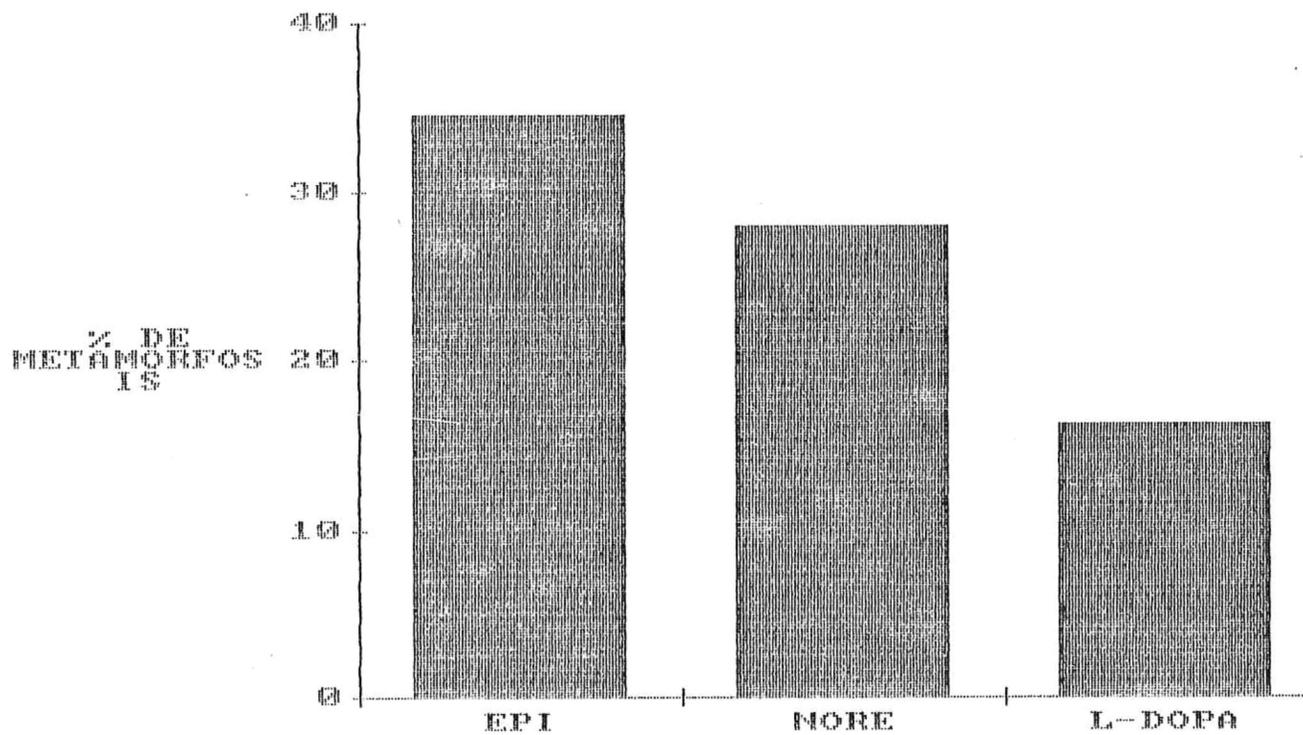


FIGURA 4: Promedio general de cada compuesto para el total del asentamiento.

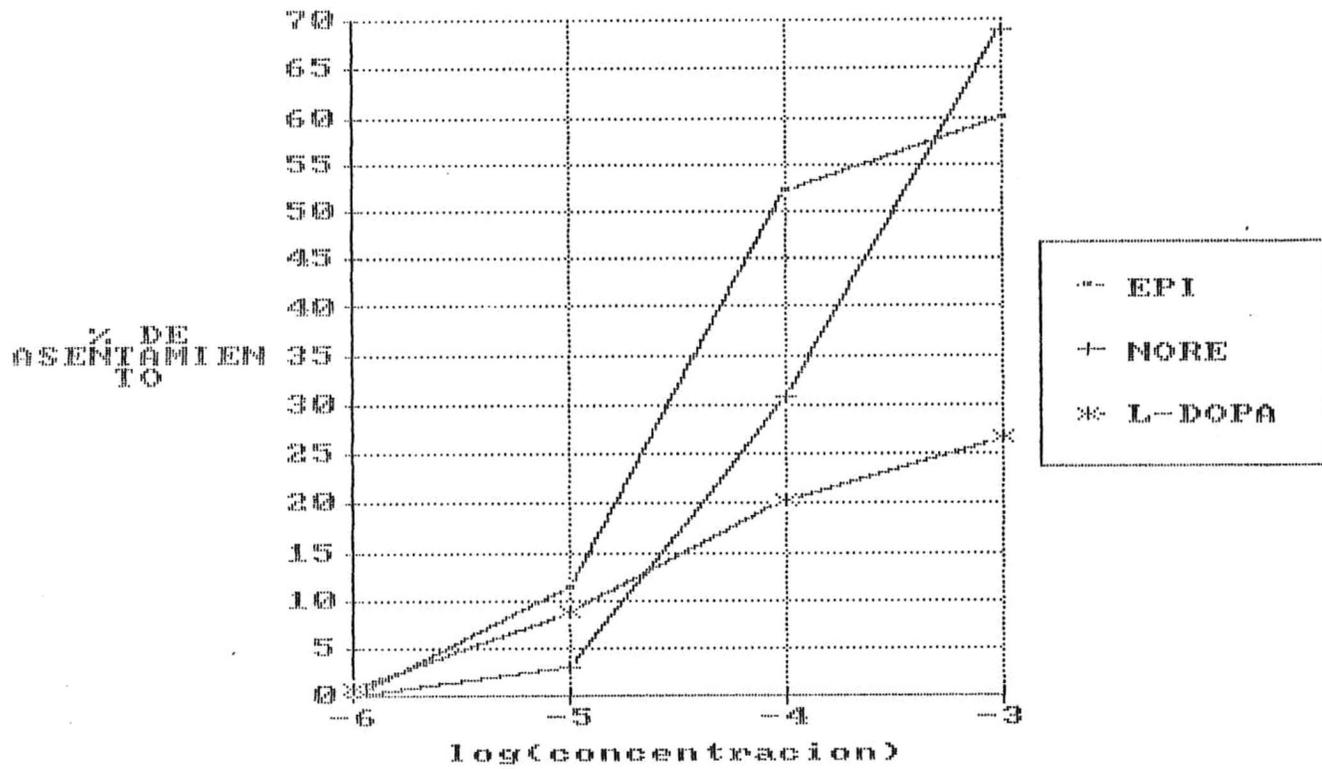


FIGURA 5: Promedio de induccion para el total del asentamiento de cada concentracion.

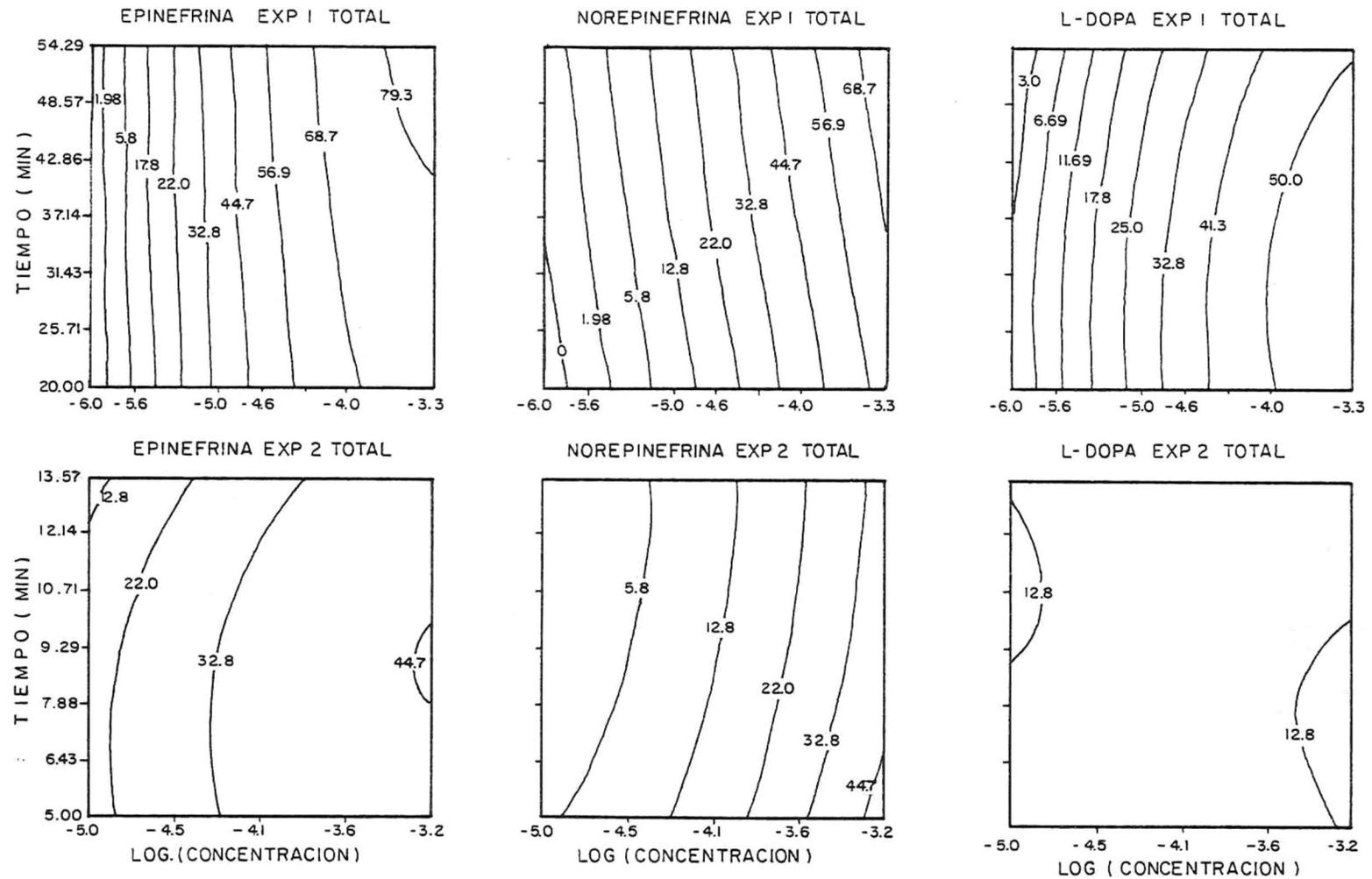


FIGURA 6 - GRAFICAS PREDICTIVAS GENERADAS CON LA TECNICA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA, PARA EL TOTAL DEL ASENTAMIENTO.

estándar de la regresión, para evitar que se traslapen las líneas.

En el apéndice se presentan las ecuaciones que se utilizaron en las gráficas de superficies de respuesta y que se obtuvieron con las regresiones múltiples, además de una prueba "F" para la regresión.

3.2 Inducción a semilla sin cementarse

Los resultados para la inducción a semilla sin cementarse, son muy similares a los del total. Para éstos, se lograron diferenciar 18 grupos, coincidiendo los integrantes del grupo 1, con los del grupo 1 del total (tabla V). Siendo el mejor promedio de metamorfosis de 82.88%. Los resultados de los demás grupos, se observan en la figura 7, en donde el de menor importancia mostró un promedio de 0.0%, grupo que incluye al testigo.

La tabla VI presenta el resultado del anova de tres vías para ambos experimentos, en donde las diferencias entre las tres variables (compuesto, concentración y tiempo de exposición), así como entre las combinaciones de éstos, se aceptan con una certeza de hasta 99%.

El mejor inductor a semilla sin cementarse fué la

TABLA V: Ordenamiento de los 18 gupos diferenciados para semilla sin cementar con la prueba LSD al 95% de confianza.

		TIEMPO (MIN) →						
		5	10	15	20	40	60	
EPI NEFRINA	(M)	-3	9	10	9	4	4	4
		-4	9	9	13	5	4	1
		-5	16	18	18			
		-6				18	18	18
NO EPI NEFRINA	(M)	-3	6	8	9	3	1	2
		-4	11	13	15	12	5	4
		-5	18	18	18			
		-6				18	18	18
L D O P A	(M)	-3	12	17	18	7	9	9
		-4	18	18	14	13	9	14
		-5	18	18	18			
		-6				18	18	18
AGUA DE MAR			18	18	18	18	18	18

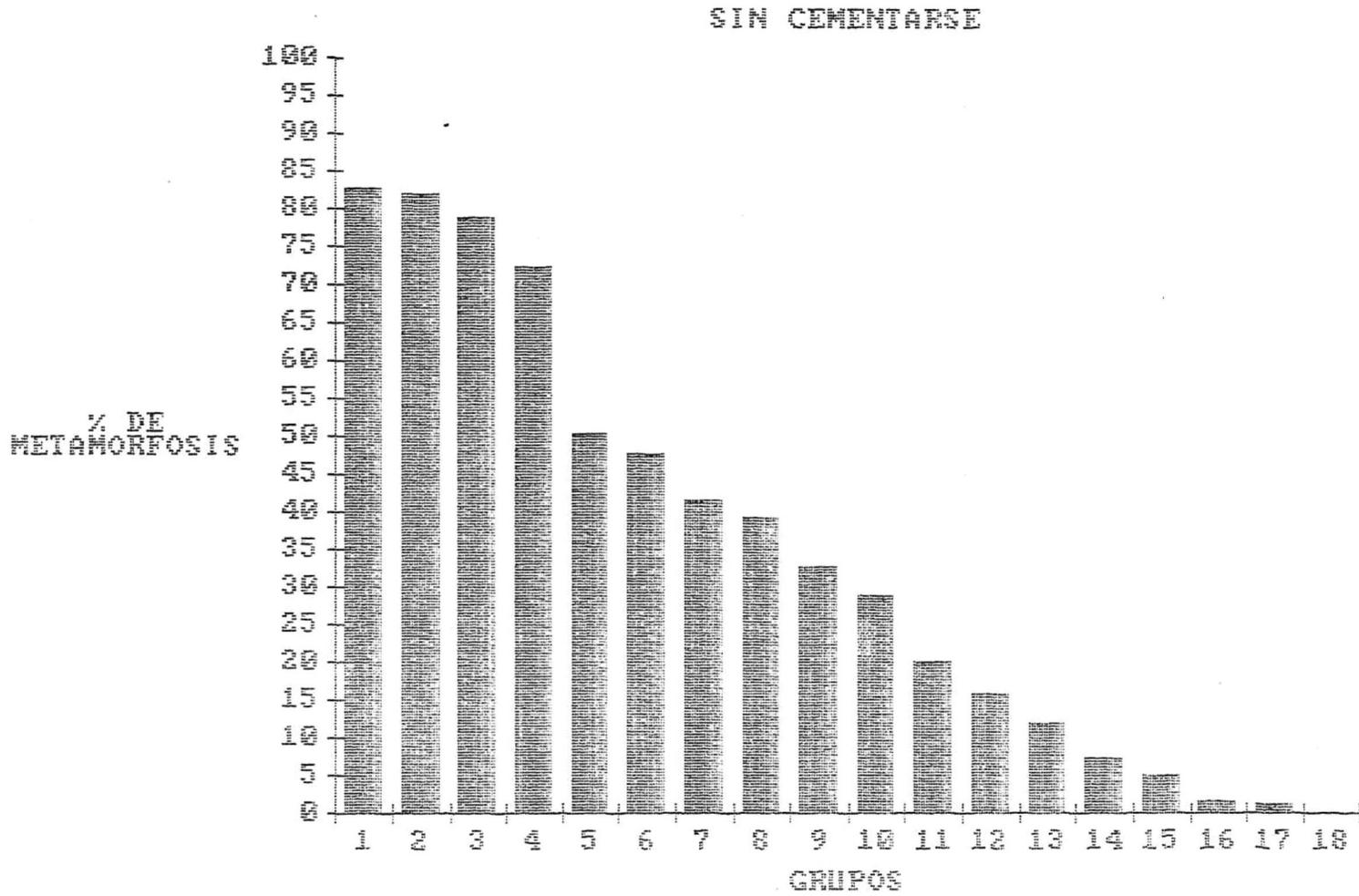


FIGURA 7: Promedios de asentamiento que presentaron los 18 grupos diferenciados para semilla sin cementar.

TABLA VI: Resultado del analisis de varianza de tres vias para la semilla sin cementarse del experimento 1 y 2. Donde *= $P<0.01$, **= $P<0.05$, ***= $P<0.1$, NS=no significativo.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	MEDIA DE CUADRADOS	F
COMPUESTO	27707.38	3	9269.128	*
CONCENTRACION	28643.41	2	14321.70	*
TIEMPO	153.8242	2	76.91211	*
COMP x CONC	13330.57	6	2221.762	*
COMP X TIEMPO	951.0586	6	158.5098	*
CONC X TIEMPO	1009.316	4	252.3291	*
COMP X CONC X TIEMPO	914.3281	12	76.19401	*
ERROR	771.5938	72	10.71658	

EXPERIMENTO 1

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	MEDIA DE CUADRADOS	F
COMPUESTO	10961.34	3	3653.778	*
CONCENTRACION	6884.281	2	3442.140	*
TIEMPO	572.8379	2	286.419	*
COMP x CONC	4846.476	6	807.744	*
COMP X TIEMPO	214.0254	6	35.6709	*
CONC X TIEMPO	240.1836	4	60.0459	*
COMP X CONC X TIEMPO	751.7188	12	62.64323	*
ERROR	563.126	72	7.821194	

EXPERIMENTO 2

epinefrina, con un promedio general de 26.70% (figura 8). Pero la concentración de los tres compuestos que mejores resultados obtuvo, fué la de $10E-3$ M, con un promedio de 61.65% para la norepinefrina, 48.05% la epinefrina, y 17.23% L-DOPA (figura 9).

De la misma manera que en los totales, la figura 10 señala como principal fuente de variación, a la concentración de los compuestos, y cómo el factor tiempo, aumenta su influencia hacia los tiempos inferiores a 20 minutos o sea el experimento 2. Esto se puede comprobar con la suma de cuadrados de la tabla VI, en donde el tiempo tiene un aumento de 153.82 en el experimento 1 a 572.83 en el experimento 2. Las ecuaciones obtenidas, a partir de la regresión múltiple, que se utilizaron para generar las gráficas de superficies de respuesta se muestran en el apéndice, junto con una prueba "F" para la regresión.

3.3 Semilla cementada

De semilla cementada se diferenciaron 15 grupos (tabla VII), en donde el mayor promedio de fijación se encontró a los 20 minutos de la concentración $10E-4$ M de L-DOPA con el 32.8% de inducción y 0.0% para el grupo 15

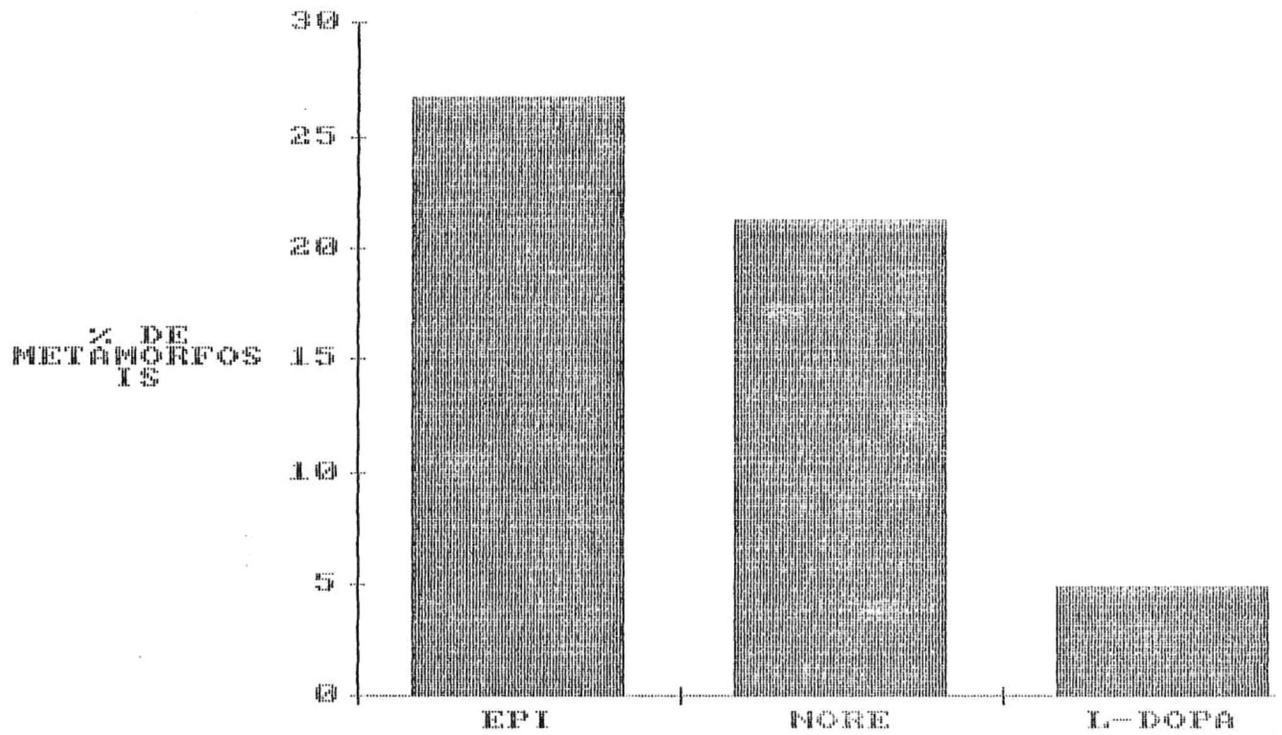


FIGURA 8: Promedio general de cada comuesto para semilla sin cementar.

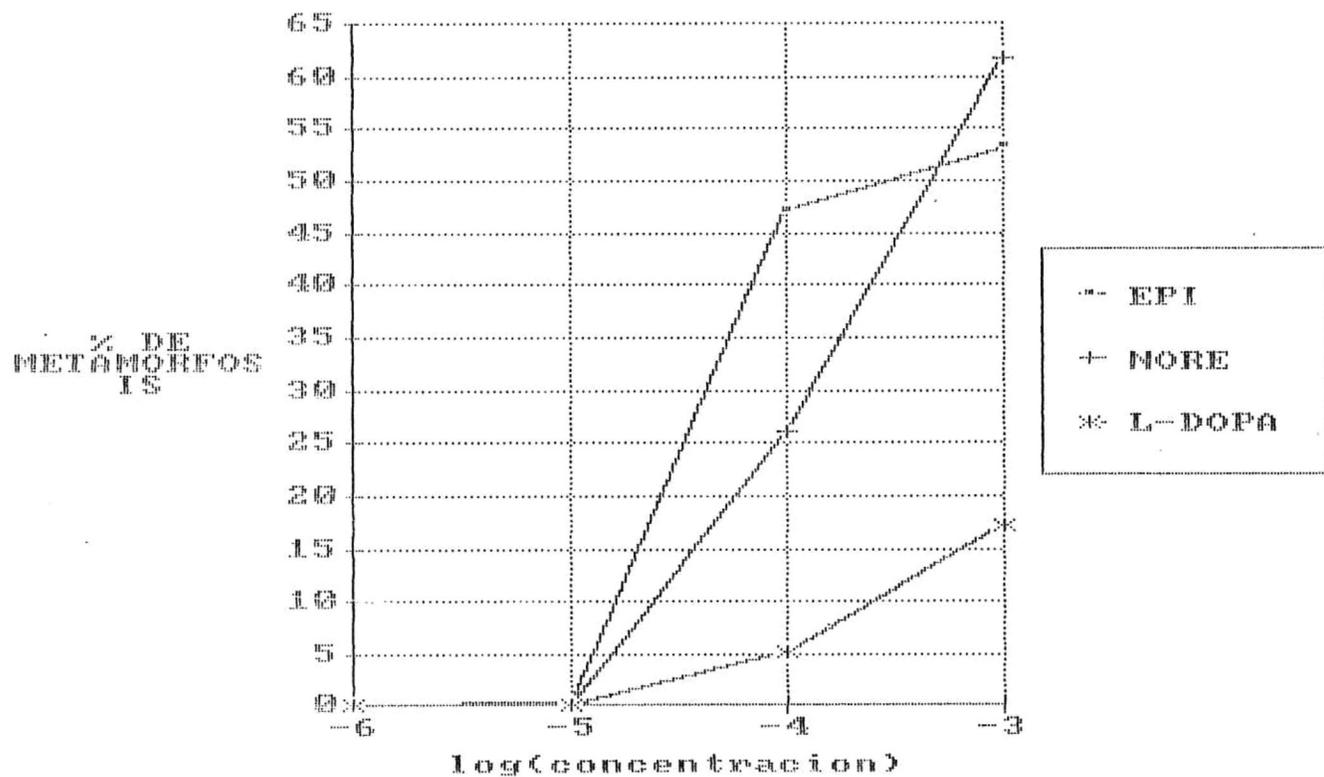


FIGURA 9: Promedio de induccion para semilla sin cementar a cada concentracion.

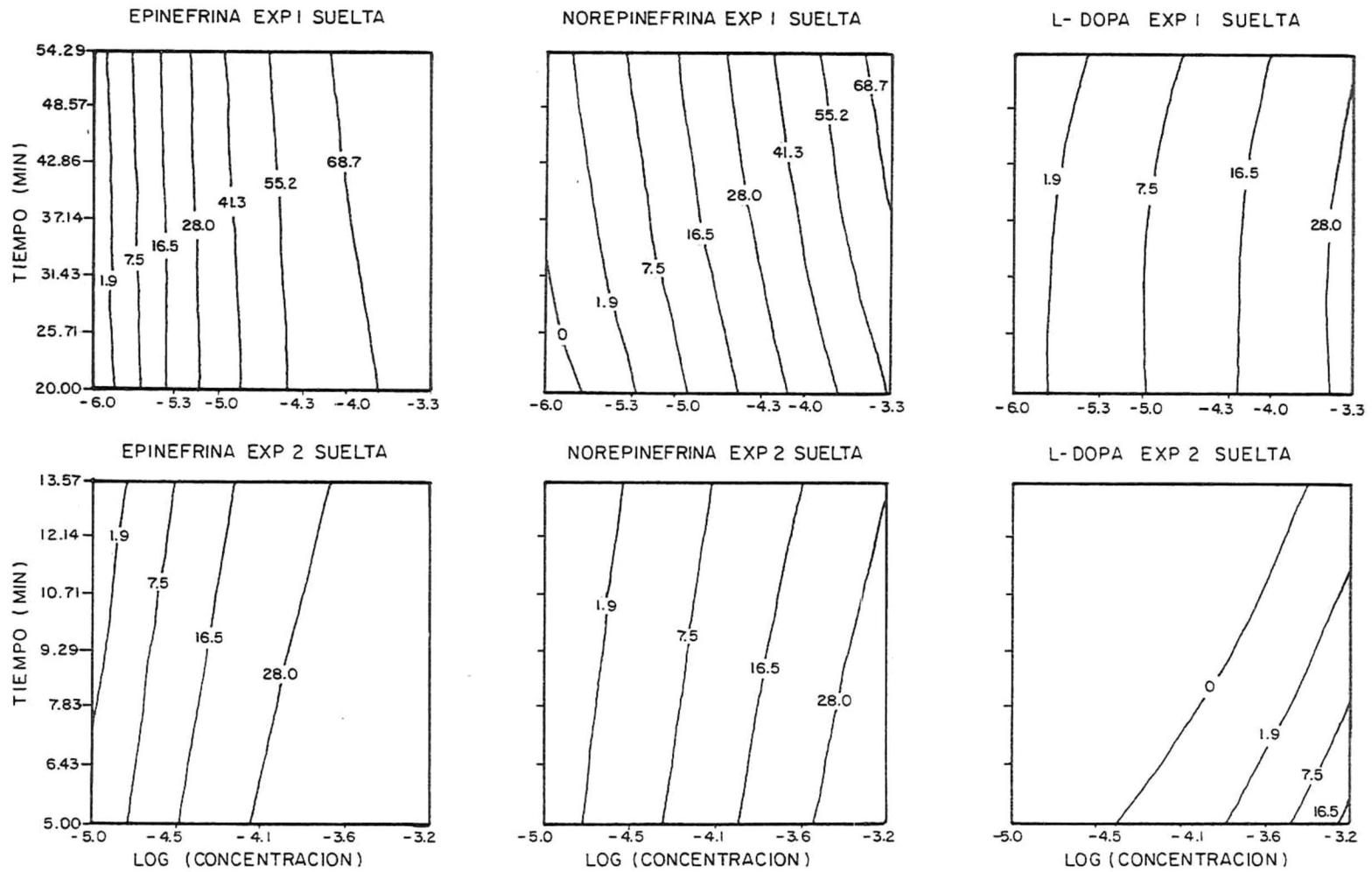


FIGURA 10.- GRAFICAS PREDICTIVAS GENERADAS CON LA TECNICA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA PARA SEMILLA SIN CEMENTAR.

TABLA VII: Ordenamiento que presentan los 15 grupos diferenciados para semilla cementada, con la prueba LSD al 95 % de confianza.

		TIEMPO (MIN) →						
		5	10	15	20	40	60	
EPIHEFRINA	(M)	-3	12	13	13	15	9	9
		-4	10	13	11	13	14	15
		-5	10	3	5			
		-6				15	15	15
NOREPIHEFRINA	(M)	-3	11	8	4	13	15	15
		-4	12	12	15	14	14	15
		-5	13	15	12			
		-6				15	15	15
LIDOPA	(M)	-3	14	11	15	6	4	6
		-4	11	8	15	1	2	7
		-5	12	5	12			
		-6				15	15	15
AGUA DE MAR			15	15	15	15	15	15

(fig.11). En esta sección, el efecto combinado de los tres factores fue significativo hasta el 99%, pero a diferencia de las secciones anteriores la concentración del compuesto tiene una disminución muy marcada de su influencia en el experimento 2, lo que se comprueba con la disminución de la suma de cuadrados que se da en la tabla VIII, llendo de 2351.87 para el experimento 1 hasta 43.88 para el experimento 2 y disminuyendo por consiguiente el grado de significancia con la que se acepta de 99% en el experimento 1 a no haber diferencias significativas entre los resultados que se obtienen con una u otra concentración, sucede lo mismo para la combinación de concentración X tiempo. Esto significa, que no existen evidencias significativas, que demuestren que alguna concentración o combinación de concentración X tiempo, es mejor que otra. Para el experimento 1, tanto el efecto combinado de compuesto X tiempo, como de concentración X tiempo, se aceptaron solo al 90%.

El L-DOPA, resulto ser el mejor inductor para semilla fija, con un promedio general de 8.17% contra 3.79% encontrado en epinefrina y 2.9% con norepinefrina (fig.12). Además, la concentración que mejores resultados dió fué $10E^{-3}$ M. con un promedio de 14.8% (fig.13), diferente a lo que reporta Cooper (1982) de $10E^{-5}$ M como la mejor concentración para obtener este tipo de semilla.

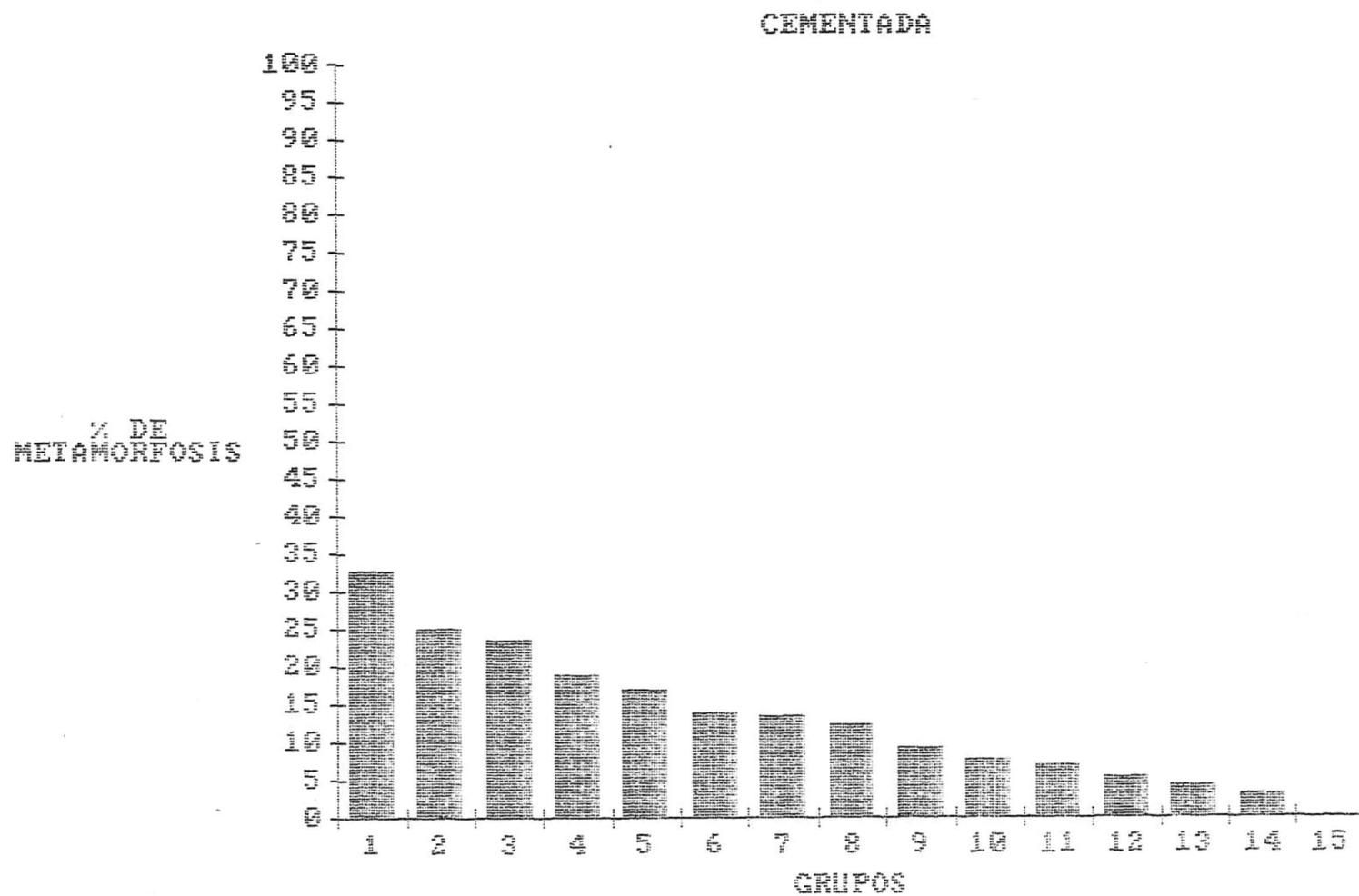


FIGURA 11: Promedios de asentamiento que presentaron los 15 grupos diferenciados para semilla cementada.

TABLA VIII: Resultados del analisis de varianza de tres vias para la semilla cementada para el experimento 1 y 2. Donde *= $P<0.01$, **= $P<0.05>0.01$ ***= $P<0.1>0.05$, NS=no significativo.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	MEDIA DE CUADRADOS	F
COMPUESTO	9887.619	3	1662.54	*
CONCENTRACION	2351.874	2	1175.937	*
TIEMPO	156.7588	2	78.3794	*
COMP x CONC	1683.17	6	280.5283	*
COMP X TIEMPO	234.5518	6	39.09196	***
CONC X TIEMPO	150.7266	4	37.68164	***
COMP X CONC X TIEMPO	491.2373	12	40.93644	*
ERROR	1100.641	72	15.28668	

EXPERIMENTO 1

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	MEDIA DE CUADRADOS	F
COMPUESTO	3923.728	3	1307.909	*
CONCENTRACION	43.88477	2	21.94238	NS
TIEMPO	219.2197	2	109.6099	*
COMP x CONC	853.9189	6	142.3198	*
COMP X TIEMPO	574.7094	6	95.78438	*
CONC X TIEMPO	172.3184	4	43.07959	NS
COMP X CONC X TIEMPO	997.8916	12	83.15763	*
ERROR	2053.448	72	28.52012	

EXPERIMENTO 2

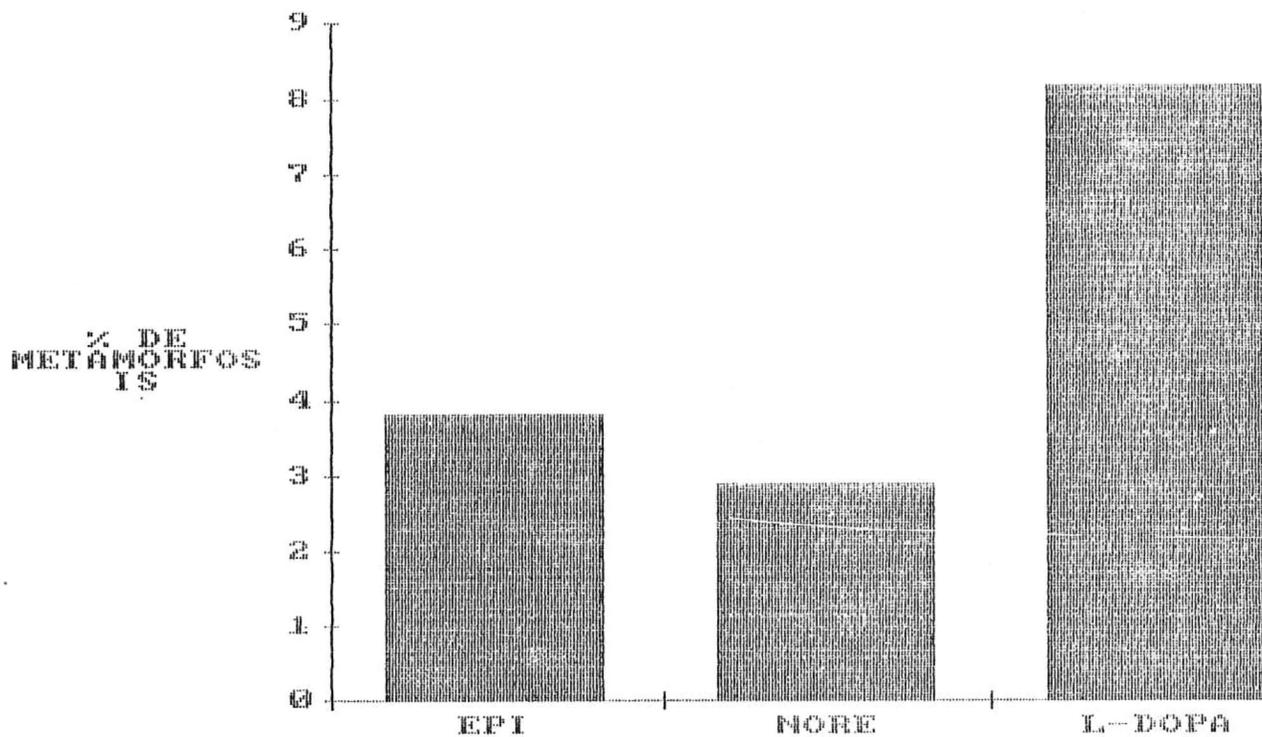


FIGURA 12: Promedio general de cada compuesto para semilla cementada.

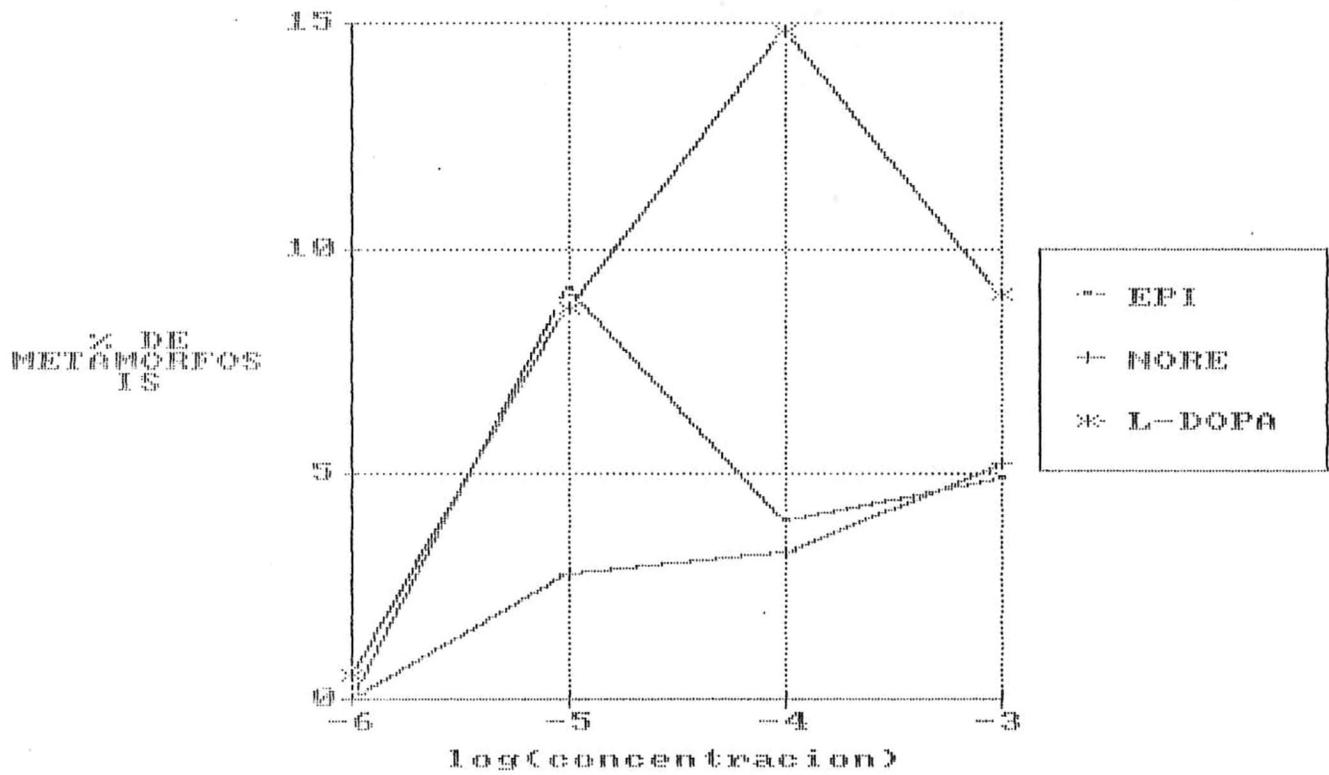


FIGURA 13: Promedio de induccion para semilla cementada a cada concentracion.

Para esta sección, las gráficas de superficies de respuestas que se obtuvieron, tienen un comportamiento mucho mas influenciado por el tiempo que lo encontrado anteriormente, lo que es mas notorio en el experimento 2, al tener las isolíneas una mayor curvatura. Por los bajos porcentajes de cementación encontrados para epinefrina y norepinefrina, el número de isolíneas que se pueden reconocer tomando en cuenta el error estandar de la regresión son muy pocos. Así, para epinefrina, solo se pude diferenciar la línea del 2% en el experimento 1 y del 7.5% para el experimento 2 (fig.14). El apéndice muestra las ecuaciones que se utilizaron para las superficies de respuesta y que se obtuviéron con la regresión múltiple y una prueba "F" para la regresión.

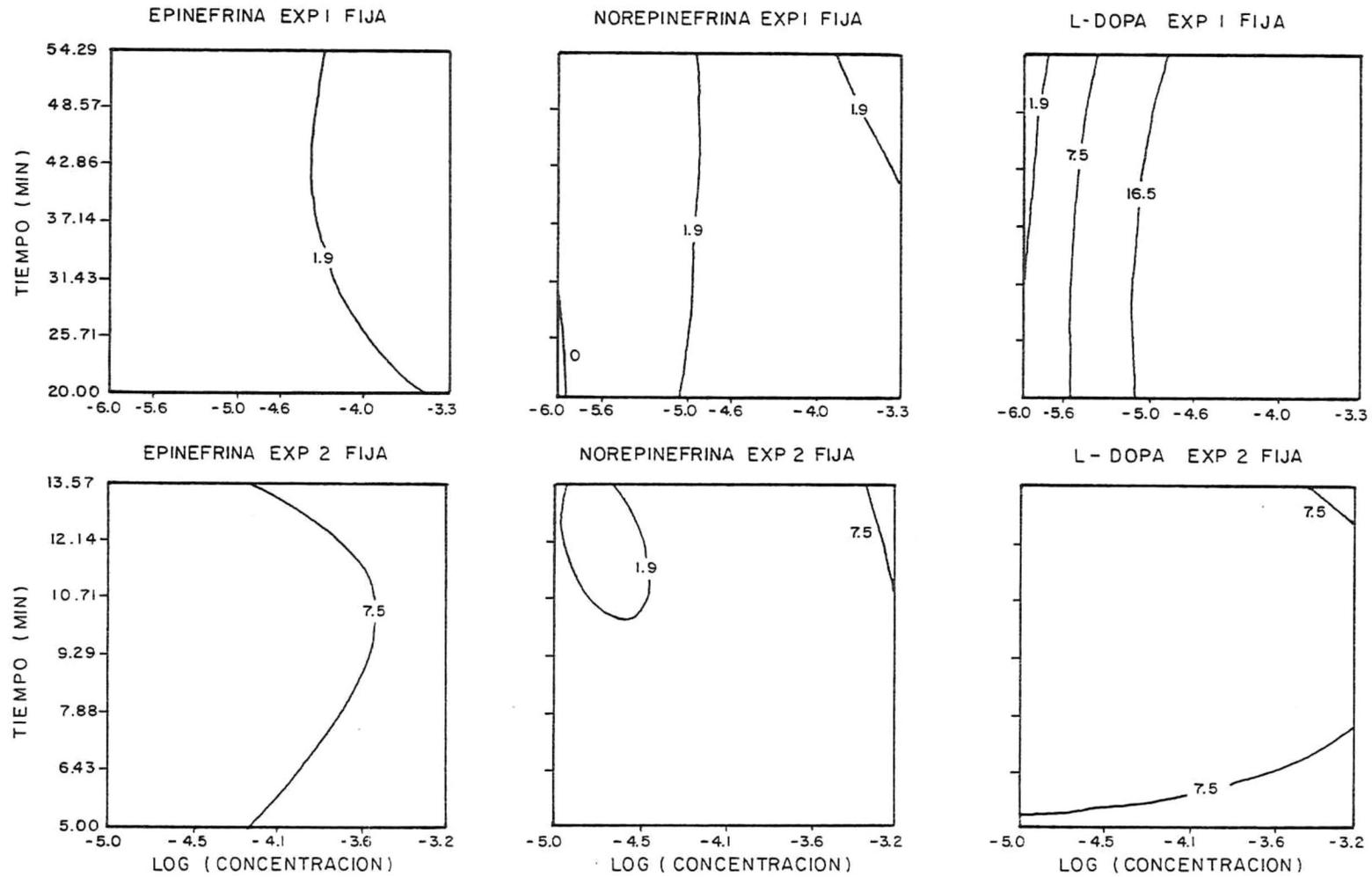


FIGURA 14 - GRAFICAS PREDICTIVAS GENERADAS CON LA TECNICA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA, PARA LA SEMILLA CEMENTADA .

4.0 DISCUSION

4.1 Inducción Total

Weiner y Colwell(1982),Cooper(1982) y Coon et al.(1985,1986) encontraron, que el L-DOPA, así como las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina, son fuertes inductores para larvas de C. gigas. Y esta depende además del compuesto, de la concentración y el tiempo de exposición a éstos. Morse et al.(1979), encontró para abulones utilizando GABA, una concentración óptima de $10E-4$ M y un tiempo de 2-3 días.

En este trabajo, la mejor explicación de las variaciones de asentamiento, esta dada por el efecto combinado de los tres factores (tabla IV), al aceptarse las diferencias entre estos hasta el 99% de confianza, lo que significa, que todos los cambios en la respuesta esta en función del compuesto la concentración y el tiempo de exposición. Además, se encontraron diferencias entre cada una de las variables (compuestos, concentraciones y tiempos de exposición), o sea que cada una de las variables actúan con diferente intensidad. Coon et al.(1985), al utilizar para C. gigas epinefrina, norepinefrina y L-DOPA encontró que en exposiciones continuas de los compuestos la mejor concentración es de

10E-4 M. La encontrada por este trabajo, fué 10E-3 y el mejor tiempo de exposición (el máximo utilizado), de 60 minutos. La diferencia entre los óptimos reportados para la concentración, y el encontrado por este estudio, tiene como única variación el tiempo de exposición. Coon et al. (op cit.), reporta que se presentan inhibiciones del poder de los inductores en exposiciones continuas a concentraciones iguales o mayores a 10E-3 M, para cualquiera de los tres compuestos, atribuyendo esta reducción a un efecto tóxico causado por de los productos de oxidación de los compuestos. Hadfield (1984), tratando de inducir larvas de Pestilla sibogae, para evitar éste efecto, provó exposiciones de 6 días a los mismos compuestos y concentraciones (10E-3, 10E-4 M), pero las 4 primeras horas, las soluciones eran cambiadas por unas recién preparadas, al cuarto cambio se dejaba a las larvas con el compuesto hasta que se completaran los 6 días. Los resultados que obtuvo, fueron los de un incremento en la mortalidad de las larvas.

Áparentemente, la toxicidad de los compuestos, esta en función de la concentración inicial y el tiempo de exposición. Pero a concentraciones iguales o inferiores a 10E-3 y tiempos de exposición menores a 60 minutos, la fuerza tóxica de éstos no es aún considerable, ya que no se observaron inhibiciones significativas en ésta

combinación de tiempo y concentración para las catecolaminas epinefrina y norepinefrina. En el caso de L-DOPA, la inhibición hacia las mayores concentraciones, comienza a ser clara entre los valores de $10E-5$ y $10E-4$ M y tiempos de exposición mayores a 30 minutos (fig.6). Coon et al.(1985), reporta esta inhibición para el L-DOPA, a estas mismas concentraciones, pero no informa sobre los tiempos de exposición. Tomando en cuenta ésta inhibición, los mejores resultados del compuesto se encontraron en las mayores concentraciones.

Nelson (1924), reporta que desde que la larva se deposita en el sustrato, hasta que termina la fijación, transcurren al rededor de 9-13 minutos, por lo que al utilizar tiempos de exposición entre este rango de tiempo, la inhibición encontrada en el experimento 2 con aumentos de tiempo pudo ser provocado por la manipulación de las larvas durante el cambio de las soluciones por agua de mar. Debido a este fenómeno, el ajuste de los resultados a la ecuación propuesta por Lough (1975), fué muy pobre por ser este un modelo cuadrático.

4.2 Inducción a semilla sin cementar

Coon et al.(1986), demostró que la epinefrina y la

norepinefrina, inducen la metamorfosis de las larvas de C. gigas sin la cementación, afirmación comprobada por éste estudio, donde se demuestra que son los reactivos que mejores resultados ofrecen en la obtención de este tipo de semilla.

Al igual que en la sección anterior, la metamorfosis esta explicada tanto por los compuestos como por las concentraciones y los tiempos de exposición.

Basicamente, todos los resultados concuerdan con los de la sección anterior, debido a que la mayoría de las larvas inducidas no presentan el período de cementación, y por consiguiente, las regresiones que generan las gráficas de superficies de respuesta en el experimento 2, tienen un mejor ajuste (apéndice) con la excepción de las de L-DOPA.

El hecho de que utilizando epinefrina y norepinefrina, se presenten promedios de metamorfosis mayores a 80%, es de singular importancia para todos los laboratorios de producción de semilla suelta, ya que al compararse esta técnica con las utilizadas tradicionalmente para obtener ostrilla sin cementar (Walne,1981), esta es relativamente mas simple, además de no requerir material especializado. Coon et al.(1986), dice que el costo de epinefrina que se necesita para preparar 5 litros de una

solución $10E^{-4}$ M, suficiente para tratar mas de 5×10^5 larvas, es menor a \$0.14 dils.

La habilidad de los compuestos neuroactivos y sus análogos estructurales, para inducir metamorfosis en larvas de moluscos a sido ampliamente demostrada (e.g. Hadfield, 1978; Morse et al. 1979; Cooper, 1983; Morse, 1984). El modo de acción de los compuestos y su relación con los inductores naturales, permanece desconocido (Coon et al., 1985).

Las larvas inducidas con epinefrina y norepinefrina, no presentaron durante el asentamiento, la característica fase en la cual reptan, al contrario del L-DOPA, donde sí se presentan todas las fases del asentamiento propuestas por Nelson (1924). Coon et al. (1985), sugiere que la inducción esta controlada por dos factores. Uno externo (L-DOPA), en el que se incluiría la fijación y la metamorfosis y otro interno que es el que controlaría solo la metamorfosis (epinefrina y norepinefrina).

Al utilizar un inductor que actúa de una manera interna como epinefrina y norepinefrina, la larva no tiene el estímulo externo para cementarse, empezando la metamorfosis sin que esto ocurra.

La razón por la que una parte de las larvas inducidas

por estos compuestos, si lograron fijarse al sustrato, es la alta relación estructural que existe entre estos compuestos y el L-DOPA según lo reporta Coon et al. (1985).

4.3 Semilla cementada

Así como epinefrina y norepinefrina, resultaron excelentes inductores para obtener semilla sin cementarse, el L-DOPA, probó ser el mejor compuesto para obtener semilla cementada. Obteniendo resultados de hasta 32.8%, un magnífico porcentaje si se compara con lo reportado por los Laboratorios de producción comercial, en donde generalmente fluctúa entre el 1% y el 25% (Krantz, 1982; Walne, 1958). En lo que respecta a lo encontrado para los otros compuestos en el experimento 1 tanto la combinación de compuesto X tiempo, como la de concentración X tiempo, son los factores que menor importancia tienen en los resultados, ya que las diferencias entre estos, solo eran aceptadas al 90% de confianza (tabla VIII). Mientras que en el experimento 2 los resultados nos indica que no existen diferencias significativas, entre las concentraciones utilizadas, y tampoco existen entre la combinación de concentración X tiempo. Por lo demás, el resto de los factores fueron

sigificativos hasta el 99%. Esto significa, que las larvas detectan concentraciones muy bajas de los compuestos, encontrando el óptimo a la concentración $10E-4$ M.

En la figura 14, las gráficas que corresponden al experimento 2, tienen un ajuste muy pobre, debido principalmente al tiempo que requiere la larva para su fijación y que fue discutido anteriormente.

Las fuentes de L-DOPA en el medio, podrían ser películas de bacterias adheridas a algún tipo de sustrato como rocas (Weiner et al. 1985), ostiones adultos (Crisp, 1967), o ambas.

"No existen evidencias de que el L-DOPA, ocurra en el medio en el rango de $10E-4$ a $10E-5$ M (Coon et al., 1985)". De cualquier modo, concentraciones del inductor comparables con las de este estudio, posiblemente se podrían encontrar si existiera una proximidad muy estrecha entre la fuente y la larva.

Por este motivo, es posible que la larva no sea atraída hacia las fuentes por quimiotatctismo, sino mas bien por fototactismo o geotactismo.

Una gran proporción del ostión cultivado, se cria con el método de las sartas. Es en éste punto, donde el

L-DOPA tiene su principal aplicación, ya que se podría fijar larva en el material mas conveniente para el acuacultor, minimizando costos, al no tener que conseguir material especializado como conchas o colectores fabricados.

Cooper(1982), probó el potencial de aplicación del L-DOPA en sistemas de producción comercial de semilla, en donde al utilizar este compuesto la larva no presentó predilección por el tipo de sustrato, ya fueran conchas de ostión o la superficie de los frascos utilizados en el experimento. Esto puede traer dificultades en cuanto a conseguir fijaciones en sustratos desfavorables.

La utilización de los tres compuestos para inducir la metamorfosis, tiene además de conseguir un alto porcentaje de asentamiento, la ventaja de que actúan en un lapso de tiempo pequeño y que la gran variación entre los porcentajes de asentamiento que nombra Krantz (1982), como uno de los fenómenos técnicos en el que no se puede tener una predicción de éxito, es controlada por lo inductores.

La propiedad de los compuestos, de actuar en un lapso de tiempo pequeño tiene la ventaja de conseguir una talla homogénea de la semilla ya que todas reciben el estímulo en un lapso de tiempo muy similar. Y al no requerir del gran espacio que se asigna en un Laboratorio a la sección

de fijación, este espacio puede ser utilizado por sistemas de pre-engorda de semilla, aumentando así, la capacidad de producción.

Un punto importante de la inducción química de las larvas es el desarrollo que presenten posteriormente. Coon et al.(1985), reporta que semillas que se obtuvieron de esta manera, no presentaron diferencias en crecimiento al compararlas con semillas que experimentaron un asentamiento natural, al menos durante los primeros 8 meses de cultivo.

5.0 Conclusiones

Los compuestos epinefrina, norepinefrina y L-DOPA, probaron ser buenos inductores para el asentamiento de larvas de C. gigas.

Tanto epinefrina como norepinefrina, inducen principalmente la metamorfosis sin la fijación.

Al utilizar L-DOPA, un gran porcentaje de las larvas que alcanzan la metamorfosis, si logran cementarse, obteniendo semilla sin cementar y cementada.

La concentración $10E-3$ M y el tiempo de 60 minutos, fué la combinación de factores donde mejores resultados se obtuvieron.

Para tiempos de mas de 20 minutos, la concentración de los compuestos es el principal factor que regula la metamorfosis. Mientras que para tiempos menores, el factor tiempo aumenta la influencia que tiene en el resultado final.

El L-DOPA, es el unico compuesto que presentó inhibición de la metamorfosis a de exposiciones superiores a 30 minutos.

Las combinaciones de concentraciones y tiempos en los

que se obtuvo el máximo asentamiento fueron los 60 minutos de exposición a la concentración de $10E-4$ M de epinefrina y los 40 minutos de exposición a $10E-3$ M de norepinefrina.

El mejor resultado obtenido para semilla sin cementarse, se logró con las mismas combinaciones de concentraciones y tiempos de exposición que para el total de asentamiento.

El mejor resultado obtenido para el caso de semilla cementada se logro con el compuesto L-DOPA, a los de 20 minutos de exposición a la concentración de $10E-4$ M.

LITERATURA CITADA

- Bayne, B.L., 1969. The gregarious behaviour of the larvae of Ostrea edulis, at settlement. J. mar. biol. Ass, U.K. 49:327-356.
- Bonar, D.B., 1976. Molluscan metamorphosis: a study in tissue transformation. Amer. Zool., 16:573-591.
- Buddecke, E., 1983. Elementos de Bioquímica pag:341-345. ed Omega S.A. Barcelona España.
- Burke, R.D., 1983. The induction of marine invertebrate larvae: stimulus and response. Can. J. Zool., 61:1701-1719.
- Coon, S.L., D.B., Bonan & R.M. Weiner, 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster Crassostrea gigas by L-DOPA and catecholamines. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 94:211-221
- Coon, S.L., D.B., Bonan & R.M. Weiner, 1986. Chemical production of cultchless oyster spat using Epinephrine and Norepinephrine. Aquaculture, 58:255-262.
- Cooper, K., 1982. Potential for application of the chemical DOPA to commercial bivalve setting systems. J. Shellfish Res., 3:110-111 Abstract.
- Crisp, D.J., 1965. Surface chemistry, a factor in the settlement of marine invertebrate larvae. Botanica Gothoburgensia III. Proceedings of the Fifth Marine Biological Symposium, Gotenborg, 51-65.
- Crisp, D.J. & P.S. Meadows, 1962. Chemical basis of the gregariousness in Cirripedes. Proc. R. Soc. B., 156:500-520.
- Crisp, D.J. & P.S. Meadows. 1963. Adsorbed layer: the stimulus to settlement in barnacles. Proc. R. Soc. B., 158:364-387.
- 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.
- 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.

- Hadfield, M.G., 1978. Metamorphosis in marine molluscan larvae: an analysis of stimulus and response. 165-175 In, F.S. Chia & Rice (ed). Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae, Elsevier, N.Y.
- Hadfield, M.G., 1984. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. Aquaculture, 39:283-298.
- Jaime, D.R., 1974. Cultivo del ostión japonés Crassostrea gigas en el estero de Punta Banda de la Bahía de Todos Santos, B.C., Tesis de licenciatura ESCM, UABC. pgs:1-4.
- Kempf, S.C. & A.O.B. Willows, 1977. Laboratory culture of the nudibranch Tritonia diomedea (Tritoniidae: Opisthobranchia) and some aspects of its behavioral development. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 30:261-276.
- Krantz, G.E., 1982. Oyster Hatchery Technology Series. Maryland Sea Grant. Publication number UM-SG-MAP-82-01.
- Lough, R.G., 1975. A reevaluation of the combined effects of temperature and salinity on survival and growth of bivalve larvae using response surface techniques. Fishery Bulletin, 73:86-94.
- Morse, D.E., N. Hooker, H. Duncan & L. Jensen., 1959. Gamma-aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis. Science, 204:407-410.
- Nelson, T.C., 1924. The attachment of oyster larvae. Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.), 46:143-151.
- Nie, N.H., C.H. Hull, J.C. Jenkins, K. Steinbrenner y D.H. Bent, 1975. Statistical package for the social sciences 2nd edición, 423-433. New York McGraw-Hill.
- Perron, F.E. & R.D. Turner, 1977. Development, metamorphosis and natural history of the nudibranch Doridella obscura (Corambiidae: Opisthobranchia). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 27:171-185.
- Scheltema, R.S., 1974. Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. Thalassia Jugosl., 10:263-296.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf, 1969. Biometry, 226-235. W.H. Freeman and Company (ed). San Francisco.

- Walne, P.R., 1958. The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of Ostrea edulis (L.). J. mar. biol. Ass. U.K. 37:415-425.
- Walne, P.R., 1981. Cultivo de moluscos bivalvos. Ed. Acribia, Zaragoza, (España):150-180.
- Weiner, R.M., A.M. Segall & R.R. Colwell, 1985. Characterization of a marine bacterium associated with Crassostrea virginica (The eastern oyster). Appl. Environ. Microbiol.:83-90.
- Williams, G.B., 1969. The effect of Fucus serratus in promoting the settlement of larvae of Spirohis borealis, Poliqueta. J. mar. biol. Ass. U.K., 44: 397-414.

6.0 A P E N D I C E

El apéndice muestra los coeficientes de las ecuaciones utilizadas para generar las gráficas de superficies de respuesta, además de una prueba "F" para la regresión que generó los coeficientes de cada uno de los compuestos donde * $P < 0.01$, ** $P < 0.05 > 0.01$, *** $P < 0.1 > 0.05$, NS=no significativo.

Epinefrina experimento 2 asentamiento total

$$A = C1 + C2(X) + C3(Y) + C4(X**2) + C5(XY) + C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

$$C1 = -0.29887E 02$$

$$C2 = -0.33072E 02$$

$$C3 = 0.49894E 01$$

$$C4 = -0.46828E 01$$

$$C5 = 0.49350E 00$$

$$C6 = -0.20504E 00$$

fuerza de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	2457.67	5	491.53	*
desviación	934.59	21	44.50	
variación total	3392.26	26		

bondad de ajuste = 0.7245

desviación estandar = 30.57094

Epinefrina experimento 1 asentamiento total

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5((XY))+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis
 X=concentración
 Y=tiempo
 XY=concentración * tiempo

C1=-0.35909E 02
 C2=-0.53333E 02
 C3= 0.45020E 00
 C4=-0.78685E 01
 C5= 0.69475E-01
 C6= 0.17913E-03

fuentes de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática
regresión	20889.78	5	4177.96
desviación	696.11	21	33.15
variación total	21585.89	26	

bondad de ajuste = 0.9678

desviación estandar = 26.3852

Norepinefrina experimento 2 asentamiento total

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis
 X=concentración
 Y=tiempo
 XY=concentración * tiempo

C1= 0.19659E 03
 C2= 0.59606E 02
 C3=-0.34548E 01
 C4= 0.49811E 01
 C5=-0.16883E 00
 C6= 0.11411E 00

fuentes de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
----------------------	-------------------	--------------------	------------------	---

regresion	6194.21	5	1238.84	*
desviación	964.48	21	45.93	
variación total	7158.69	26		

bondad de ajuste = 0.8653

desviación estandar = 31.05564

Norepinefrina experimento 1 asentamiento total

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1= 0.10936E 03

C2= 0.18948E 02

C3= 0.46591E 00

C4=-0.18019E 00

C5= 0.16090E-01

C6=-0.14764E-02

fuentes de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	19509.26	5	3901.85	*
desviación	1164.42	21	55.45	
variación total	20673.68	26		

bondad de ajuste = 0.9437

desviación estandar = 34.12306

L-DOPA experimento 1 asentamiento total

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración
 Y=tiempo
 XY=concentración * tiempo

C1= 0.12575E 01
 C2=-0.26852E 02
 C3= 0.56600E 00
 C4=-0.43734E 01
 C5= 0.17832E-01
 C6=-0.94585E-02

fFuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	9088.03	5	1817.61	*
desviación	605.89	20	30.29	
variación total	9693.92	25		

bondad de ajuste = 0.9382

desviación estandar = 24.61525

L-DOPA experimento 2 asentamiento total

$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$

C1= 0.80092E 02
 C2= 0.30248E 02
 C3= 0.58233E 00
 C4= 0.25794E 01
 C5=-0.10118E 01
 C6=-0.27850E 00

fFuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática
regresión	805.25	5	161.05
desviación	853.58	18	47.42
variación total	1658.83	23	

bondad de ajuste = 0.4854

desviación estandar = 29.21594

Norepinefrina experimento 2 sin cementar

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

$$C1= 0.13464E 03$$

$$C2= 0.30184E 02$$

$$C3=-0.28833E 01$$

$$C4= 0.90610E 00$$

$$C5=-0.46700E 00$$

$$C6= 0.13778E-01$$

fuerza de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	6322.31	5	1264.46	*
desviación	221.57	21	10.55	
variación total	6543.88	26		

bondad de ajuste = 0.9661

desviación estandar = 14.8829

Norepinefrina experimento 1 sin cementar

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

$$C1= 0.11776E 03$$

$$C2= 0.27669E 02$$

$$C3= 0.89359E 00$$

$$C4= 0.91463E 00$$

$$C5= 0.41637E-01$$

$$C6=-0.49722E-02$$

fFuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	19251.82	5	3850.36	*
desviación	1174.53	21	55.93	
variación total	20426.35	26		

bondad de ajuste = 0.9425

desviación estandar = 34.27111

Epinefrina experimento 1 sin cementar

$$A = C1 + C2(X) + C3(Y) + C4(X**2) + C5(XY) + C6(Y**2)$$

A = % de metamorfosis

X = concentración

Y = tiempo

XY = concentración * tiempo

C1 = -0.42242E 02
 C2 = -0.56966E 02
 C3 = 0.14347E 00
 C4 = -0.83098E-01
 C5 = 0.24493E-01
 C6 = 0.10861E-02

fFuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	18498.60	5	3699.72	*
desviación	907.88	21	43.23	
variación total	19406.48	26		

bondad de ajuste = 0.9532

desviación estandar = 30.13206

Epinefrina experimento 2 sin cementar

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

$$C1=-0.81975E 02$$

$$C2=-0.73540E 02$$

$$C3= 0.54454E-01$$

$$C4=-0.10828E 02$$

$$C5= 0.24217E 00$$

$$C6= 0.42669E-02$$

fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	5359.52	5	1071.90	*
desviación	631.54	21	30.07	
variación total	5991.06	26		

bondad de ajuste = 0.8946

desviación estandar = 25.13079

Norepinefrina experimento 1 sin cementar

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

$$C1= 0.11776E 03$$

$$C2= 0.27669E 02$$

$$C3= 0.89359E 00$$

$$C4= 0.91463E 00$$

$$C5= 0.41637E-01$$

$$C6=-0.49722E-02$$

f fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	19251.82	5	3850.36	*
desviación	1174.53	21	55.93	
variación total	20426.35	26		

bondad de ajuste = 0.9425

desviación estandar = 34.27111

L-DOPA experimento 1 sin cementar

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1= 0.70389E 02
C2= 0.12793E 02
C3= 0.33393E 00
C4= 0.22468E 00
C5= 0.77338E-02
C6=-0.57552E-02

f fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	5344.35	5	1068.87	*
desviación	569.30	20	28.47	
variación total	5913.65	25		

bondad de ajuste = 0.9037

desviación estandar = 23.85986

L-DOPA experimento 1 sin cementar

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1= 0.70389E 02

C2= 0.12793E 02

C3= 0.33393E 00

C4= 0.22468E 00

C5= 0.77338E-02

C6=-0.57552E-02

fuerza de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	5344.35	5	1068.87	*
desviación	569.30	20	28.47	
variación total	5913.65	25		

coeficiente de correlación =0.9506

desviación estandar = 23.85986

Epinefrina experimento 1 cementada

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1= 0.71125E 01

C2= 0.38623E 01

C3= 0.92155E 00

C4= 0.54013E 00

C5= 0.12358E 00

C6=-0.47524E-02

f fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	799.10	5	159.82	*
desviación	566.16	20	28.31	
variación total	1365.26	25		

bondad de ajuste =0.5853

desviación estandar = 23.79415

Epinefrina experimento 2 cementada

$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1=-0.11290E 02

C2=-0.16547E 01

C3= 0.42594E 01

C4= 0.59941E 00

C5= 0.37717E 00

C6=-0.15509E 00

f fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	319.59	5	63.92	NS
desviación	1106.89	21	52.71	
variación total	1426.48	26		

bondad de ajuste = .2240

desviación estandar = 33.26991

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1=-0.82567E 01

C2=-0.16428E 02

C3=-0.74121E 00

C4=-0.25293E 01

C5=-0.11787E 00

C6= 0.19111E-02

fuentes de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadrática	F
regresión	515.47	5	103.09	*
desviación	398.35	21	18.97	
variación total	913.81	26		

bondad de ajuste = 5641

desviación estandar = 19.95869

L-DOPA experimento 2 cementada

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1=-0.31676E 02

C2=-0.88991E 01

C3= 0.59222E 01

C4=-0.95766E 00

C5=-0.22600E 00

C6=-0.36167E 00

fuerate de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	639.82	5	127.96	***
desviación	746.06	20	41.45	
variación total	1385.88	26		

bondad de ajuste = 0.4617

desviación estandar = 27.31403

L-DOPA experimento 1 cementada

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1=-0.77572E 02

C2=-0.50559E 02

C3= 0.53194E 00

C4=-0.61644E 01

C5= 0.34787E-01

C6=-0.66940E-02

fuerate de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	3235.34	5	647.07	*
desviación	618.67	20	30.97	
variación total	3854.00	26		

bondad de ajuste = 0.8395

desviación estandar = 24.87358

Norepinefrina experimento 2 cementada

$$A=C1+C2(X)+C3(Y)+C4(X**2)+C5(XY)+C6(Y**2)$$

A=% de metamorfosis

X=concentración

Y=tiempo

XY=concentración * tiempo

C1=0.79422E 02

C2=0.31315E 02

C3=0.47900E 00

C4=0.38611E 01

C5=0.48433E 00

C6=0.83311E-01

fuerate de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	media cuadratica	F
regresion	705.21	5	141.04	***
desviación	1065.95	21	50.76	
variación total	1771.16	26		

bondad de ajuste = 0.3982

desviación estandar = 32.64886