

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

**EFFECT OF EPINEPHRINE, NOREPINEPHRINE AND L-DOPA
ON THE SETTLEMENT AND METAMORPHOSIS OF
LARVAE OF *Crassostrea gigas***

Lewis McAnally Salas
Heberto Cavazos Lliteras
Alfredo Salas Garza

Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado Postal 453
Ensenada, Baja California, México

McAnally Salas, L., Cavazos Lliteras, H. y Salas Garza, A. Efecto de la epinefrina, norepinefrina y L-Dopa en el asentamiento y metamorfosis de larvas de *Crassostrea gigas*. Effect of epinephrine, norepinephrine and L-Dopa on the settlement and metamorphosis of larvae of *Crassostrea gigas*. Ciencias Marinas, 15(4):85-103, 1989.

RESUMEN

Para inducir a la metamorfosis, larvas de *Crassostrea gigas* fueron tratadas con epinefrina, norepinefrina y L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa), con diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Epinefrina y norepinefrina probaron ser excelentes inductores para obtener semilla suelta (82 y 83%) a la concentración de 10^{-3} Molar 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 (33%), a una concentración de 10^{-4} Molar y un tiempo de exposición de 60 minutos.

ABSTRACT

In order to induce metamorphosis, larvae of *Crassostrea gigas* were exposed to epinephrine, norepinephrine and L-3,4 dihydroxyphenylalanine (L-Dopa), with different concentrations and exposure times. Epinephrine and norepinephrine proved to be excellent inducers of cultchless spat (82 and 83%), at a concentration of 10^{-3} Molar and exposure time of 60 minutes. The largest amount of cemented spat (33%) was obtained with L-Dopa, at a concentration of 10^{-4} Molar and exposure time of 60 minutes.

INTRODUCCION

En los laboratorios de producción de semilla de ostión, las etapas de operación, producción de larvas pediveliger, larvas que alcanzan la metamorfosis y sobrevivencia de la semilla, exhiben una gran variación y menor eficiencia de la que reporta la literatura

INTRODUCTION

In laboratories producing oyster seed, the stages of operation, production of pediveliger larvae, larvae that metamorphose and survival of the spat, are highly variable and less efficient than what is reported in the literature. However, a reliable prediction does

científica, pero el punto donde se carece de una predicción confiable es en la etapa de la metamorfosis, siendo éste el fenómeno técnico más frustrante encontrado hasta ahora (Krantz, 1982).

La capacidad para aumentar la atracción a las superficies de fijación incrementaría los niveles de producción de los laboratorios productores ya instalados. 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. Doyle (1974) indica que la respuesta al asentamiento en muchas larvas de invertebrados marinos, está controlada por un número de factores intrínsecos y extrínsecos, incluyendo el hereditario, la edad de las larvas (Hadfield, 1977), su historial de nutrición (Kempf y Willows, 1977; Perron y Turner, 1977) y las características físico-químicas existentes en el sustrato (Williams, 1964).

Las investigaciones más recientes sobre el problema, se han enfocado sobre el potencial que presentan algunas sustancias químicas en el asentamiento de larvas de ostión, encontrándose que algunos compuestos simples, actúan como activadores del asentamiento de algunas especies de invertebrados marinos (Cooper, 1983), componentes como succil colina en opistobranquios (Bonar, 1976), y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) en haliótidos (Morse *et al.*, 1979) entre otros. Se ha encontrado que estas sustancias tienen un papel neuroactivo en muchos invertebrados (Hadfield, 1984).

Experimentos con *Crassostrea virginica* y *C. gigas* muestran que una película de bacterias asociadas a juveniles de ostión, favorecen el asentamiento y la metamorfosis de las larvas, y que la L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa) o los productos de su oxidación (e.g. pigmentos de melanina) aislados de cultivos de estas bacterias son también 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 se caracterizan por actuar como neurotransmisores reguladores de procesos biológicos y metabólicos (Buddecke, 1983).

not exist for the metamorphosis stage, which is the most frustrating technical phenomenon encountered to date (Krantz, 1982).

The capacity to increase the attraction of the settling surfaces would increase the production of the laboratories. In order to control metamorphosis in molluscan larvae, research has been carried out to determine the factor responsible for regulating this phenomenon. Doyle (1974) indicates that the settlement response in many marine invertebrate larvae is regulated by a number of intrinsic and extrinsic factors, including hereditary, larval age (Hadfield, 1977), nutritional history of the larva (Kempf and Willows, 1977; Perron and Turner, 1977) and physical and chemical characteristics of available substrata (Williams, 1964).

Recent studies have been focused on the potential of some chemical substances in the settlement of oyster larvae. Some simple compounds have been found to stimulate settlement in some species of marine invertebrates (Cooper, 1983), such as succinylcholine in opisthobranchs (Bonar, 1976) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in haliotoids (Morse *et al.*, 1979) among others. These substances have been found to play a neuroactive role in many invertebrates (Hadfield, 1984).

Experiments with *Crassostrea virginica* and *C. gigas* show that bacteria associated to juvenile oysters favour the settlement and metamorphosis of the larvae and that L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa) or its oxidation products (e.g. melanin pigments) isolated from cultures of these bacteria are also active agents (Weiner *et al.*, 1985). L-Dopa and the melanin pigments are precursors of the catecholamines (dopamine, norepinephrine, epinephrine and octopamine), which act as regulating neurotransmitters of biological and metabolic processes (Buddecke, 1983).

Coon *et al.* (1985) tested the effect of some catecholamines and L-Dopa in inducing settlement and metamorphosis of *C. gigas*. By exposing larvae to concentrations of 10^{-4} M, they obtained a response of more than 90% with epinephrine and more than 80% with norepinephrine, and at concentrations of 10^{-5} M, of only 20 to 50% with L-Dopa. Without

Coon *et al.* (1985), probaron el efecto de algunas catecolaminas y la L-Dopa, como inductor de asentamiento y metamorfosis de *C. gigas*. Mediante la exposición de las larvas a concentraciones de 10^{-4} M de epinefrina obtuvieron una respuesta mayor al 90%, con norepinefrina mayor del 80% y con L-Dopa a concentraciones de 10^{-5} M sólo del 20 al 50%, mientras que sin inductor, los asentamientos no fueron mayores del 15%.

Debido a las posibilidades que estos inductores presentan para los laboratorios productores, se pretende determinar mediante la técnica de superficie de respuesta, el efecto combinado de la concentración y el tiempo de exposición de larvas pediveliger de *C. gigas* a los compuestos; norepinefrina, epinefrina, y L-Dopa.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) en verano de 1987. Se indujo el desove mediante estímulo térmico para obtener las gametas y consecuentemente las larvas de *C. gigas*, las cuales se cultivaron utilizando la metodología estándar utilizada en el Laboratorio de Moluscos del IIO (McAnally, 1988); en tanques de 1200 litros, cambios de agua cada tercer día y alimentándolas diariamente con *Isochrysis* aff. *galbana* var. *Tahithiana* y *Monochrysis lutheri* en proporción 1:1 a concentraciones de 30,000 cel/ml durante las primeras dos semanas y 50,000 cel/ml durante las últimas dos. Durante los experimentos la temperatura fluctuó entre los 20 y 22°C.

En los experimentos, se utilizaron larvas pediveliger retenidas en un tamiz de 314 micras con mancha ocular bien desarrollada y notable actividad en búsqueda de sustrato.

Los términos "asentamiento" y "metamorfosis" usados en este estudio, están rigurosamente definidos por Scheltema (1974). El final del período nadador, la subsecuente etapa donde la larva reptar por el sustrato y por último, su cementación, es lo que se denomina "asentamiento". Antes de la cementación, el asentamiento es reversible. La transición mor-

an inducer, the settlements were not greater than 15%.

The objective of this study is to determine, by means of the response surface technique, the combined effect of concentration and exposure time of pediveliger larvae of *C. gigas* to norepinephrine, epinephrine and L-Dopa.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were carried out at the Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) of the Universidad Autónoma de Baja California (UABC) in summer 1987. Spawning was induced by means of thermal stimulus to obtain the gametes and consequently the larvae of *C. gigas*, which were cultured in 1200 litre tanks using the standard methodology employed at the IIO (McAnally, 1988). The water was changed every third day and they were fed daily on *Isochrysis* aff. *galbana* var. *Tahithiana* and *Monochrysis lutheri* in a 1:1 ratio at concentrations of 30,000 cel/ml during the first two weeks and 50,000 cel/ml during the last two weeks. The temperature fluctuated between 20 and 22°C during the experiments.

In the experiments, pediveliger larvae were used, kept in a 314 micron sieve, with well-developed eye spot and notable activity in search of substratum.

The terms "settlement" and "metamorphosis" used in this study are defined by Scheltema (1974). "Settlement" refers to the end of the swimming period, the subsequent stage in which the larva crawls over the substratum and, finally, its cementation. Prior to cementation, settlement is reversible. "Metamorphosis" refers to the morphogenetic transition from larval to juvenile morphology, which normally begins with cementation and which is irreversible at this point.

In order to estimate the interactive effects of the compounds, concentrations and exposure times, a 4x3 factorial was designed for each compound. The experiment was carried out with three replicates, testing the three substances at concentrations of 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-6} M with exposure times of 20, 40 and 60 minutes. A control experiment was also

fogenética de larva a una morfología juvenil, que normalmente comienza con la cementación, es lo que se denomina "metamorfosis", la cual en ese momento es irreversible.

Para estimar los efectos interactivos de los compuestos, las concentraciones y los tiempos de exposición, se diseñó un factorial de 4×3 para cada compuesto. El experimento se corrió por triplicado, probando las tres sustancias a concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-6} M con tiempos de exposición de 20, 40 y 60 minutos. El cuarto nivel del factor compuesto dentro del diseño experimental se asignó a los testigos que no fueron expuestos a sustancia alguna. Cada unidad experimental consistió de recipientes de vidrio de 150 ml, llenos con 100 ml de agua de mar y con una densidad promedio de 1 larva/ml.

Las unidades experimentales tuvieron un ordenamiento aleatorio para eliminar el problema de la pseudoreplicación. Al término del tiempo de exposición, las larvas se enjuagaron abundantemente con agua de mar y se dejaron al volumen original por 48 horas para permitir el desarrollo de la disoconcha en las larvas metamorfizadas. Se fijaron con formol al 5% para su evaluación posterior con ayuda del microscopio para diferenciar las que presentaron la disoconcha. Se distinguieron semillas sueltas y cementadas en el recipiente. Los resultados experimentales se dividieron en tres; semilla suelta, semilla cementada y la suma de los dos anteriores como metamorfosis total. Las proporciones del total se transformaron al función arcoseno de la raíz cuadrada (Sokal y Rohlf, 1981). Los datos cumplieron con la normalidad y la homogeneidad de varianza, determinadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett respectivamente.

Se aplicó un ANOVA de tres vías para cada uno de los resultados (suelta, cementada y total) y determinar la importancia e interacciones entre los compuestos, concentraciones y tiempos de exposición. Para los factores que mostraron un efecto significativo, se aplicó una prueba de comparaciones múltiples por contraste.

Para obtener gráficas predictivas de la metamorfosis como semilla suelta, fija y total, se utilizó la técnica de superficies de respuesta, utilizando el modelo de la forma:

carried out, in which the larvae were not exposed to any substance. Each experimental unit consisted of 150 ml glass containers, filled with 100 ml of seawater and mean density of 1 larva/ml.

The experimental units were ordered at random to eliminate the problem of pseudo-replication. At the end of the exposure time, the larvae were rinsed with seawater and left at original volume for 48 hours in order to allow the development of the dissoconch in the metamorphosed larvae. They were fixed with formol (5%) and subsequently evaluated, under a microscope, to differentiate those that presented the dissoconch. Cultchless and cemented spats were distinguished. The experimental results were divided into cultchless spat, cemented spat and total metamorphosis which is the sum of both. The ratios over the total were transformed with the function arcsine of the square root (Sokal and Rohlf, 1981). The data complied with normality and homogeneity of variance, as determined by the tests of Kolmogorov-Smirnov and Bartlett, respectively.

A three-way ANOVA was applied to the results (cultchless, cemented and total) in order to determine the importance and interactions between the compounds, concentrations and exposure times. For the factors which showed a significant effect, a test of multiple comparisons by contrast was applied.

In order to obtain prediction charts of the metamorphosis as cultchless spat, cemented spat and total metamorphosis, the response surface technique was used, using a model of the form:

$$y = b_0 + b_1(C) + b_2(T) + b_3(C^2) + b_4(T^2) + b_5(C \times T)$$

donde:

y = respuesta en porcentaje de la metamorfosis,
 b = coeficiente de la regresión,
 C = concentración del compuesto,
 C² = efecto cuadrático de la concentración,
 T = tiempo de exposición,
 T² = efecto cuadrático del tiempo de exposición,
 C x T = efecto de la interacción entre concentración y tiempo de exposición.

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

RESULTADOS

Metamorfosis total

El ANOVA de tres vías indica un efecto significativo de las tres variables experimentadas y por consiguiente en sus interacciones. La variación en la metamorfosis está dada principalmente, en orden de importancia, por la concentración, el compuesto y el tiempo (Tabla I). La prueba de comparaciones múltiples para cada una de las variables muestra diferencias significativas al 95% entre todos los compuestos y todas las concentraciones, mientras que en el factor tiempo sólo entre los 20 y 40 minutos se encontraron diferencias significativas (Tabla II).

Los testigos no presentaron metamorfosis en ninguna de las unidades experimentales. En cuanto a la metamorfosis total, la norepinefrina fue el compuesto que registró el valor máximo de metamorfosis con un 84%, la epinefrina del 83% y la L-Dopa del 56%.

La Figura 1a, muestra las superficies de respuesta para epinefrina generada con la ecuación:

$$y = -35.909 + [-53.333(C)] + 0.4502(T) + [-7.8685(C^2)] + 0.00017913(T^2) + 0.069475(C \times T)$$

where:

y = response in percentage of the metamorphosis,
 b = regression coefficient,
 C = concentration of the compound,
 C² = quadratic effect of the concentration,
 T = exposure time,
 T² = quadratic effect of the exposure time,
 C x T = effect of the interaction between concentration and exposure time.

The coefficients of the equation were calculated by means of multiple regression by steps, equalling the levels of F to zero in order to accept or remove the variables (Lough, 1975). Furthermore, the insertion order of the variables was determined using the partial correlation coefficient as a measure of their importance.

RESULTS

Total metamorphosis

The three-way ANOVA indicates a significant effect of the three experimental variables and, therefore, of their interactions. The variation in metamorphosis is mainly given, in order of importance, by concentration, compound and time (Table I). The multiple comparison test for each one of the variables shows significant differences at 95% between all the compounds and all the concentrations. For the time factor, significant differences were only found between 20 and 40 minutes (Table II).

The control did not present metamorphosis in any of the experimental units. With regard to total metamorphosis, the maximum value of 84% was recorded for norepinephrine, 83% for epinephrine and 56% for L-Dopa.

Figure 1a shows the response surfaces for epinephrine generated with the equation:

Tabla I. Análisis de varianza de tres vías de la metamorfosis total, para las variables; compuesto, concentración y minutos de exposición.

Table I. Three-way variance analysis for total metamorphosis, for the variables: compound, concentration and exposure time in minutes.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Media Cuadrática	F	P
Compuesto	28474.469	3	9491.490	686.451	0.000
Concentración	34561.356	2	17280.678	1249.788	0.000
Tiempo	102.793	2	51.396	3.717	0.029
Compuesto por Concentración	13895.688	6	2315.948	167.496	0.000
Compuesto por Tiempo	1306.287	6	217.715	15.746	0.000
Concentración por Tiempo	596.244	4	149.061	10.781	0.000
Compuesto por Concentración por Tiempo	1013.888	12	84.491	6.111	0.000
Error	981.709	71	13.827		

con un coeficiente de correlación de 0.9678. Se generó una cordillera ascendente, hacia las concentraciones y tiempos mayores, mostrando la isolínea de mejor respuesta (85%) entre los 55 y 60 minutos de exposición y concentraciones entre $10^{-3.5}$ y 10^{-3} M.

Con norepinefrina la ecuación resultante es:

$$y = 109.36 + 18.948(C) + 0.46591(T) + [-0.18019(C^2)] + 0.01609(T^2) + [-0.0014764(C \times T)]$$

con un coeficiente de correlación de 0.9437. La importancia de los factores concentración y tiempo resultaron muy similares como puede inferirse de la Figura 1b, que muestra las isolíneas con inclinaciones aproximadas a los 45 grados. En esta superficie se distingue la isolínea del 100% en una amplia gama de tiempos de exposición, de 35 a 60 minutos, y de concentraciones, de $10^{-5.3}$ a 10^{-3} M.

En L-Dopa (Fig. 1c) la ecuación resultante es:

with a correlation coefficient of 0.9678. An ascending ridge was generated towards the higher concentrations and longer times, showing the isoline of better response (85%) between 55 and 60 minutes of exposure and concentrations between $10^{-3.5}$ and 10^{-3} M.

For norepinephrine, the equation is:

with a correlation coefficient of 0.9437. The importance of the concentration and time factors proved to be very similar as can be inferred from Figure 1b, which shows the isolines with slopes near 45°. In this surface, the 100% isoline can be distinguished in a wide range of exposure times, 35 to 60 minutes, and of concentrations, $10^{-5.3}$ to 10^{-3} M.

For L-Dopa (Fig. 1c), the equation is:

Tabla II. Prueba de comparaciones múltiples por contraste para los resultados de metamorfosis total, entre compuestos, concentraciones y minutos de exposición. * = significancia al 95% de confianza. NS = no significativos.

Table II. Test of multiple comparisons by contrast for the total metamorphosis results, between compounds, concentrations and exposure time in minutes. * = 95% confidence significance. NS = not significant.

	C O M P U E S T O			TESTIGO
	EPI	NORE	L-DOPA	
EPI		*	*	*
NORE				*
L-DOPA				*

	C O N C E N T R A C I O N		
	10E-3	10E-4	10E-6
10E-3		*	*
10E-4			*

	T I E M P O (M I N U T O S)		
	20	40	60
20		*	NS
40			NS

$$y = 1.2575 + [-26.852(C)] + 0.566(T) + [-4.3734(C^2)] + [-0.0094585(T^2)] + 0.017832(C \times T)$$

con un coeficiente de correlación de 0.9382. Al igual que para epinefrina resultó una cordillera ascendente pero hacia altas concentraciones y bajos tiempos de exposición, encontrándose la isolínea de mejor respuesta (55%) a concentraciones iguales o mayores a $10^{-3.5}$ M y con tiempos de exposición menores a 40 minutos (Fig. 1c).

Semilla suelta

Al igual que para la metamorfosis total el ANOVA de tres vías indica que existe un efecto significativo, en orden de importancia, de las variables concentración, compuesto y tiempo (Tabla III). En la prueba de comparaciones múltiples, sólo los 40 y 60 minutos no

with a correlation coefficient of 0.9382. Like epinephrine, there was an ascending ridge but towards high concentrations and short exposure times. The isoline of better response (55%) was found at equal or higher concentrations than $10^{-3.5}$ M and with exposure times of less than 40 minutes (Fig. 1c).

Cultchless spat

Like total metamorphosis, the three-way ANOVA indicates that there is a significant effect, in order of importance, of the concentration, compound and time variables (Table III). In the multiple comparison test, only 40 and 60 minutes do not show significant differences at 95% (Table IV).

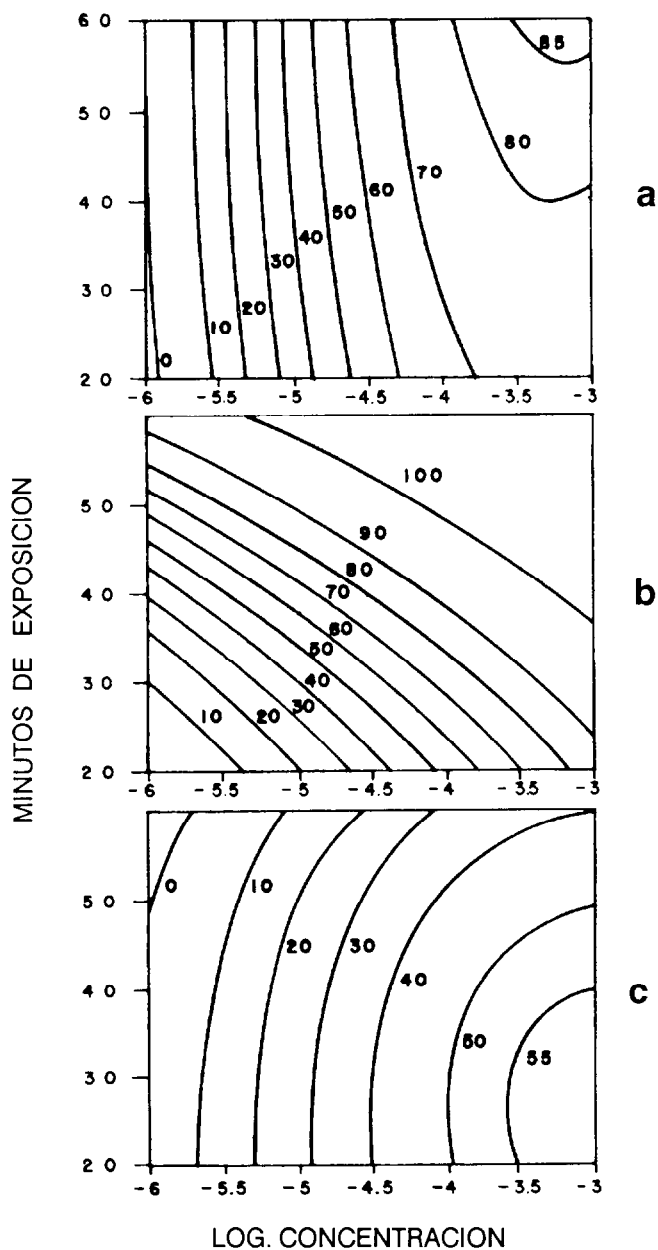


Figura 1. Superficie de respuesta para la metamorfosis total, mostrando los porcentajes para cada concentración y tiempo de exposición a los tres inductores: a) epinefrina; b) norepinefrina; c) L-Dopa.

Figure 1. Response surface for total metamorphosis, showing the percentages for each concentration and exposure time to the three inducers: a) epinephrine, b) norepinephrine, c) L-Dopa.

Tabla III. Análisis de varianza de tres vías para la semilla suelta, para las variables; compuesto, concentración y minutos de exposición.

Table III. Three-way variance analysis for cultchless spat, for the variables: compound, concentration and exposure time in minutes.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Media Cuadrática	F	P
Compuesto	25894.126	3	8631.375	720.717	0.000
Concentración	28773.760	2	14386.880	1201.300	0.000
Tiempo	161.613	2	80.807	6.747	0.002
Compuesto por Concentración	13470.352	6	2245.059	187.462	0.000
Compuesto por Tiempo	921.915	6	153.652	12.830	0.000
Concentración por Tiempo	986.183	4	246.546	20.587	0.000
Compuesto por Concentración por Tiempo	878.002	12	73.167	6.109	0.000
Error	850.302	71	11.976		

muestran diferencias significativas al 95% (Tabla IV).

La norepinefrina produjo un valor máximo del 83% de semilla suelta, mientras que epinefrina el 82% y L-Dopa el 31%.

La ecuación que se obtuvo para generar la superficie de respuesta para la semilla suelta con epinefrina es:

$$y = -42.242 + [-56.966(C)] + 0.14347(T) + [-0.083098(C^2)] + 0.0010861(T^2) + 0.024493(C \times T)$$

con un coeficiente de correlación de 0.9532. Se muestra una tendencia similar a la encontrada en la metamorfosis total, en donde el tiempo incrementa su importancia a mayor concentración. Resultó una cordillera ascendente desde el 0 al 75%, además se caracteriza por una región de inhibición aproximadamente entre $10^{-3.5}$ a 10^{-3} M y tiempos de exposición menores a 50 minutos (Fig. 2a).

La ecuación para la gráfica de norepinefrina es:

Norepinephrine produced a maximum value of 83% of cultchless spat, epinephrine 82% and L-Dopa 31%.

The equation which was obtained to generate the response surface for the cultchless spat with epinephrine is:

with a correlation coefficient of 0.9532. A similar tendency to that found for total metamorphosis can be seen, in which time increases its importance at higher concentrations. An ascending ridge was found from 0 to 75%, which is also characterized by an inhibition region approximately between $10^{-3.5}$ to 10^{-3} M and exposure times of less than 50 minutes (Fig. 2a).

The equation for the norepinephrine plot is:

Tabla IV. Prueba de comparaciones múltiples por contraste para los datos resultados de semilla suelta, entre compuestos, concentraciones, y minutos de exposición. * = significancia al 95% de confianza. NS = no significativos.

Table IV. Test of multiple comparisons by contrast for the cultchless spat results, between compounds, concentrations and exposure time in minutes. * = 95% confidence significance. NS = not significant.

	COMPUESTO		
	EPI	NORE	L-DOPA
EPI		*	*
NORE			*
L-DOPA			*

	CONCENTRACION		
	10E-3	10E-4	10E-6
10E-3		*	*
10E-4			*

	TIEMPO (MINUTOS)		
	20	40	60
20		*	*
40			NS

$$y = 117.76 + 27.669(C) + 0.89359(T) + 0.91463(C^2) + [-0.0049722(T^2)] + 0.041637$$

con un ajuste al modelo de 0.9425. Resultó una cordillera ascendente del 0 al 85% hacia las mayores concentraciones y tiempos de exposición, encontrando la máxima respuesta por encima de los 45 minutos y concentraciones entre $10^{-3.2}$ y 10^{-3} M (Fig. 2b).

La ecuación resultante para L-Dopa es:

$$y = 70.389 + 12.793(C) + 0.33393(T) + 0.22469(C^2) + [-0.0057552(T^2)] + 0.0077338(C \times T)$$

con un ajuste de 0.9037. La superficie de respuesta para la producción de semilla suelta presenta una forma similar a la de metamorfosis total, aunque la máxima respuesta es sólo del 35% a tiempos menores de 50 minutos y a concentraciones mayores a $10^{-3.2}$ M (Fig. 2c).

with a correlation coefficient of 0.9425. There was an ascending ridge from 0 to 85% towards higher concentrations and long exposure times. The maximum response was found above 45 minutes and concentrations between $10^{-3.2}$ and 10^{-3} M (Fig. 2b).

The equation for L-Dopa is:

with a correlation coefficient of 0.9037. The response surface for the production of cultchless spat is similar to that of total metamorphosis, even though the maximum response is only 35% at times under 50 minutes and at concentrations higher than $10^{-3.2}$ M (Fig. 2c).

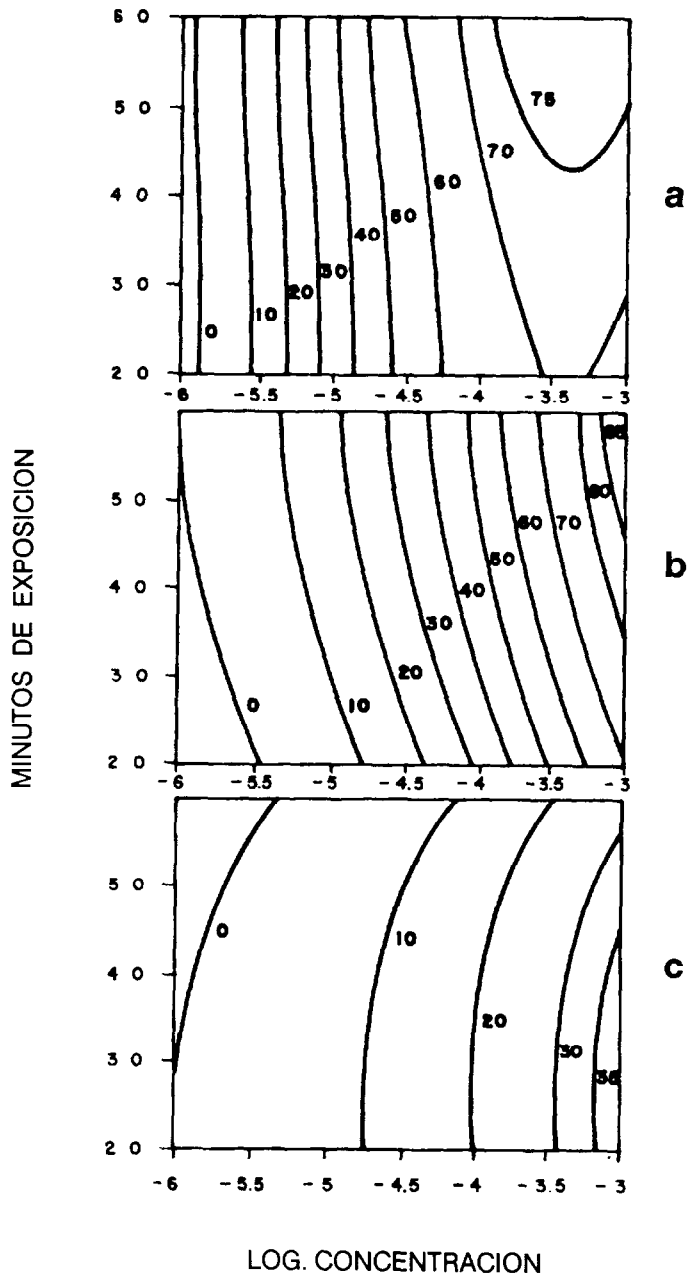


Figura 2. Superficie de respuesta para la semilla suelta, mostrando los porcentajes para cada concentración y tiempo de exposición a los tres inductores: a) epinefrina; b) norepinefrina; c) L-Dopa.

Figure 2. Response surface for the cultchless spat, showing the percentages for each concentration and each exposure time to the three inducers: a) epinephrine, b) norepinephrine, c) L-Dopa.

Semilla cementada

Para semilla cementada, el ANOVA de tres vías sólo mostró significancia para el efecto del compuesto y la concentración, siendo el compuesto la variable que explica en mayor parte la variabilidad en la producción de semilla cementada (Tabla V). Para los compuestos la prueba de comparaciones múltiples muestra diferencia entre los testigos y todos los compuestos y L-Dopa con epinefrina y norepinefrina. La concentración de 10^{-6} M resultó diferente a las demás concentraciones (Tabla VI).

El compuesto que mayor número de semilla cementada produjo fue la L-Dopa con un 33%, mientras que epinefrina y norepinefrina produjeron el 10% y 4% respectivamente.

Las ecuaciones para epinefrina y norepinefrina resultaron:

$$y = 7.1125 + 3.8623(C) + 0.92155(T) + 0.54013(C^2) + [-0.0047524(T^2)] + 0.12358(C \times T)$$

con un coeficiente de correlación de 0.5853 para el primer compuesto y:

$$y = -8.2567 + [-16.428(C)] + [-0.74121(T)] + [-2.5293(C^2)] + 0.0019111(T^2) + [-0.11787(C \times T)]$$

con 0.5641 de coeficiente de correlación para el segundo.

Las gráficas de las superficies de respuesta que se obtuvieron evidencian una mayor influencia del tiempo, lo que es evidente por las curvaturas que se registraron por el efecto cuadrático (Fig. 3). Por los bajos porcentajes de fijación encontrados para epinefrina y norepinefrina, el número de isolíneas que se pueden reconocer son las del 0 y 5%.

De las dos catecolaminas, epinefrina es la que presenta una respuesta caracterizada por una cordillera ascendente a tiempos y concentraciones mayores (Fig. 3a). La norepinefrina (Fig. 3b) presenta una pequeña región de respuesta máxima de sólo el 5%, ubicada entre la concentración de $10^{-4.2}$ y $10^{-3.2}$ M y tiempos de entre 20 y 22 minutos, mientras que a cualquier otra concentración o tiempo de exposición, existe una inhibición a la cementación.

Cemented spat

For cemented spat, the three-way ANOVA was only significant for the effect of the compound and concentration. The compound is the variable which for the most part explains the production of cemented spat (Table V). For the compounds, the multiple comparison test shows a difference between the control and all the compounds and L-Dopa with epinephrine and norepinephrine. The concentration of 10^{-6} M was found to differ from the other concentrations (Table VI).

The compound which produced the largest number of cemented spat was L-Dopa with 33%, while epinephrine and norepinephrine produced 10% and 4% respectively.

The equations for epinephrine and norepinephrine are:

with a correlation coefficient of 0.5853 for the first compound and

with a correlation coefficient of 0.5641 for the second.

The plots of the response surfaces which were obtained showed a greater dependence on time, which is evident from the curvatures which were recorded by the quadratic effect (Fig. 3). From the low settlement percentages found for epinephrine and norepinephrine, the isolines which can be recognized are those of 0 and 5%.

Of the two catecholamines, epinephrine presents a characterized response through an ascending ridge at higher concentrations and longer times (Fig. 3a). Norepinephrine (Fig. 3b) presents a small region of maximum response of only 5%, found between the concentration of $10^{-4.2}$ and $10^{-3.2}$ M and times between 20 and 22 minutes. At any other concentration or exposure time, there is an inhibition to cementation.

Tabla V. Análisis de varianza de tres vías para la semilla cementada, para las variables; compuesto, concentración y minutos de exposición.

Table V. Three-way variance analysis for cemented spat, for the variables: compound, concentration and exposure time in minutes.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Media Cuadrática	F	P
Compuesto	4827.010	3	1609.003	94.162	0.000
Concentración	2181.999	2	1091.000	63.847	0.000
Tiempo	103.050	2	51.525	3.015	0.055
Compuesto por Concentración	1707.940	6	284.657	16.659	0.000
Compuesto por Tiempo	198.738	6	33.123	1.938	0.086
Concentración por Tiempo	147.687	4	36.922	2.161	0.082
Compuesto por Concentración por Tiempo	553.461	12	46.122	2.699	0.005
Error	1213.219	71	17.088		

La ecuación que describe la respuesta de las larvas a L-Dopa es:

The equation which describes the response of the larvae to L-Dopa is:

$$y = -77.572 + [-50.559(C)] + 0.53194(T) + [-6.1644(C^2)] + [-0.006694(T^2)] + 0.034787(C \times T)$$

con un ajuste al modelo de 0.8393. Su respuesta está representada por una cima que va del 0 al 25%. La región óptima de cementación se encuentra entre $10^{-3.4}$ y $10^{-3.7}$ M de concentración y 20 a 40 minutos de exposición. Como se puede observar en las Figuras 2c y 3c, las concentraciones mayores a $10^{-3.4}$ M inhiben la cementación y promueven la producción de semilla suelta.

with a correlation coefficient of 0.8393. The response is represented by a peak which goes from 0 to 25%. The optimum region of cementation is found between $10^{-3.4}$ and $10^{-3.7}$ M of concentration and 20 to 40 minutes of exposure. As can be seen in Figures 2c and 3c, concentrations higher than $10^{-3.4}$ M inhibit cementation and cause the production of cultchless spat.

DISCUSION

La concentración de epinefrina y norepinefrina es el factor principal que influye sobre el total de la metamorfosis, lo que se deduce de las isolíneas que se encuentran más perpendiculares al eje de la concentración. Esto indica, que cambios relativamente pe-

DISCUSSION

The concentration of epinephrine and norepinephrine is the main factor influencing total metamorphosis. This is inferred from the isolines which are nearly perpendicular to the axis of the concentration and indicates that relatively small changes in the concentration

Tabla VI. Prueba de comparaciones múltiples por contraste para los resultados de semilla cementada, entre compuestos, concentraciones, y minutos de exposición. * = significancia al 95% de confianza. NS = no significativos.

Table VI. Test of multiple comparisons by contrast for the cemented spat results, between compounds, concentrations and exposure time in minutes. * = 95% confidence significance. NS = not significant.

	C O M P U E S T O		
	EPI	NORE	L-DOPA
EPI		*	*
NORE			*
L-DOPA			*

	C O N C E N T R A C I O N		
	10E-3	10E-4	10E-6
10E-3		NS	*
10E-4			*

queños en la concentración, respercuten en el porcentaje de asentamiento, mientras que cambios relativamente grandes en el factor tiempo, no provocan cambios importantes en el porcentaje de asentamiento.

A diferencia de los resultados en este trabajo, en el cual se variaron los tiempos de exposición, Coon *et al.* (1985), al utilizar epinefrina, norepinefrina y L-Dopa en exposiciones continuas encontraron que la mejor concentración es de 10^{-4} M. Estos autores, establecen que se presentan disminuciones en el poder de los inductores en exposiciones continuas a concentraciones iguales o mayores de 10^{-3} M, para cualquiera de los tres compuestos, atribuyendo esta reducción a un efecto tóxico causado por los productos de oxidación de los compuestos. Aparentemente, la toxicidad de los compuestos, está en función de la concentración inicial y el tiempo de exposición (Coon *et al.*, 1985). Pero a concentraciones iguales o inferiores a 10^{-3} M 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 esta combinación de tiempo y concentración para las catecolaminas epinefrina y norepinefrina.

affect the settlement percentage, while the relatively big changes in the time factor do not provoke important changes in the settlement percentage.

Contrary to the results of this study, in which the exposure times varied, Coon *et al.* (1985) found that the best concentration is 10^{-4} M on using epinephrine, norepinephrine and L-Dopa in continuous exposures. These authors establish that the power of the inducers in continuous exposures decreases at concentrations of 10^{-3} M or higher for any of the three compounds. They attributed this reduction to a toxic effect caused by the oxidation products of the compounds. Apparently the toxicity of the compounds is a function of the initial concentration and exposure time (Coon *et al.*, 1985). However, at concentrations of 10^{-3} M or lower and exposure times of less than 60 minutes, their toxicity is not yet considerable since no significant inhibitions were observed in this combination of time and concentration for the epinephrine and norepinephrine catecholamines.

With regard to L-Dopa (Fig. 1c), exposure times over 40 minutes and higher concentrations could be expected to have an inhibit-

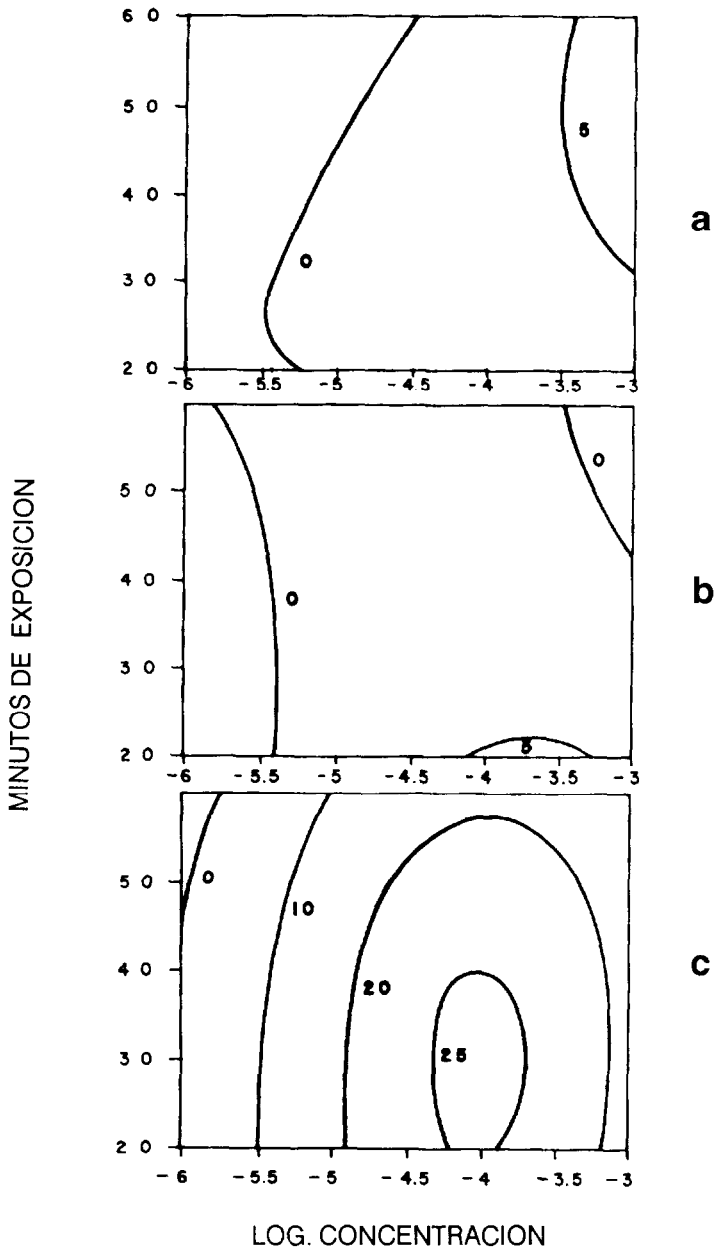


Figura 3. Superficie de respuesta para la semilla cementada, mostrando los porcentajes para cada concentración y tiempo de exposición a los tres inductores: a) epinefrina; b) norepinefrina; c) L-Dopa.

Figure 3. Response surface for the cemented spat, showing the percentages for each concentration and exposure time to the three inducers: a) epinephrine, b) norepinephrine, c) L-Dopa.

Para el caso de L-Dopa (Fig. 1c), podría pensarse que los tiempos de exposición más grandes de 40 minutos y mayores concentraciones tienen un efecto inhibitorio, ya que cabría esperar mejor respuesta a mayores tiempos como en el caso de epinefrina y norepinefrina. Coon *et al.* (1985), reportan esta inhibición para L-Dopa, a estas mismas concentraciones, aunque no indican los tiempos de exposición.

Coon *et al.* (1986) demostraron que la epinefrina y la norepinefrina, inducen la metamorfosis de *C. gigas* sin cementación, afirmación corroborada en este trabajo. El hecho de que utilizando epinefrina y norepinefrina, se pueden obtener promedios de metamorfosis superiores al 80% (Fig. 2a,b), es de singular importancia para los laboratorios productores de semilla suelta, ya que al compararse esta técnica con las utilizadas tradicionalmente para obtener semilla suelta (Walne, 1981; Vanderborgh, 1972; Dupuy, 1973), ésta es relativamente más simple, además de no requerir sistemas especializados.

Las larvas inducidas al asentamiento con epinefrina y norepinefrina, no presentaron la fase característica en la cual reptan en busca de sustrato, mientras que con L-Dopa, sí se presentan todas las fases del asentamiento propuestas por Nelson (1924). La inducción está controlada por dos factores, uno externo, en el que se incluye la cementación y la metamorfosis y otro interno que es el que controlaría sólo la metamorfosis (Coon *et al.*, 1985). De acuerdo a lo anterior, parece ser que el factor externo actúa en mayor medida con L-Dopa, mientras que el factor interno se manifiesta principalmente en 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 estimuladas con estos compuestos logran cementarse, es debido a la alta relación estructural que existe entre estas catecolaminas y L-Dopa según lo reportan Coon *et al.* (1985).

En cuanto a la producción de semilla cementada, de las dos catecolaminas, nore-

ing effect, since a better response to longer times could also be expected, as in the case of epinephrine and norepinephrine. Coon *et al.* (1985) report this inhibition for L-Dopa at these concentrations, although they do not indicate the exposure times.

Coon *et al.* (1986) showed that epinephrine and norepinephrine induce metamorphosis in *C. gigas* without cementation. This is confirmed in this study. The fact that averages of metamorphosis higher than 80% can be obtained by using epinephrine and norepinephrine (Fig. 2a,b) is of singular importance to laboratories producing cultchless spat. Compared to techniques traditionally used to obtain cultchless spat (Walne, 1981; Vanderborgh, 1972; Dupuy, 1973), this technique is relatively simpler and does not require specialized systems.

The larvae induced to settle with epinephrine and norepinephrine did not present the characteristic phase in which they crawl in search of substratum, while with L-Dopa, all the settlement phases proposed by Nelson (1924) occurred. Induction is controlled by an external factor which includes cementation and metamorphosis and an internal factor which only controls metamorphosis (Coon *et al.*, 1985). Thus, it seems that the external factor mostly acts with L-Dopa while the internal factor with epinephrine and norepinephrine.

On using an inducer which acts internally such as epinephrine and norepinephrine, the larva does not receive the external stimulation required for cementation and metamorphosis occurs without this having happened. According to Coon *et al.* (1985), the reason that some of the larvae stimulated with these compounds manage to cement, is the high structural relation which exists between these catecholamines and L-Dopa.

Of the two catecholamines norepinephrine produced the least cemented spat while L-Dopa was found to produce the most. Results of up to 33% were obtained which is excellent when compared to the percentage reported by commercial and experimental laboratories which generally fluctuates between 1 and 25% (Krantz, 1982; Walne, 1958; McAnally, 1988).

pinefrina es el inductor que menos semilla cementada produce, mientras que L-Dopa probó ser el mejor compuesto para obtenerla cementada, lográndose resultados hasta del 33%, que es un magnífico porcentaje si se compara con lo reportado por los laboratorios de producción piloto y comercial, en donde generalmente fluctúa entre el 1 y el 25% (Krantz, 1982; Walne, 1958; McAnally, 1988).

Para el caso de epinefrina, podría pensarse que incrementando la concentración y tiempo de exposición se aumentaría la producción de semilla cementada (Fig. 3a), sin embargo no hay que olvidar que epinefrina es un fuerte inductor de semilla suelta, y según la tendencia de la superficie de respuesta, incrementar la concentración y la exposición repercutirá en un mayor porcentaje de semilla suelta, y no cementada, como muestra la Figura 2a.

Una gran proporción del ostión cultivado, se cría con el método de sartas o pencas, y es en estos sistemas donde L-Dopa tiene su principal aplicación, pudiéndose manipular el asentamiento en el material más conveniente para el acuacultor, pudiendo disminuir costos, al no tener que conseguir materiales específicos para este proceso. Sin embargo, no hay que perder de vista que este hecho puede traer complicaciones en cuanto a conseguir fijaciones en sustratos desfavorables.

Cooper (1983), probó el potencial de aplicación de 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 recipientes utilizados en el experimento.

La utilización de los tres compuestos para inducir la metamorfosis, tiene la ventaja de conseguir un alto porcentaje de asentamiento, y actuar en un lapso de tiempo corto. La gran variación entre los porcentajes de asentamiento que indica Krantz (1982), como uno de los fenómenos técnicos en el que no se puede tener una predicción de éxito, en este caso es controlada por los inductores. Como beneficio adicional se consigue una talla homogénea de la semilla al recibir las larvas el estímulo en el mismo lapso de tiempo, y al no requerir del gran espacio que se asigna en un laboratorio a la sección de fijación, este

With regard to epinephrine, the production of cemented spat could be expected to increase if the concentration and exposure time were increased (Fig. 3a). However, epinephrine is a strong inducer of cultchless spat and, according to the tendency of the response surface, increasing the concentration and exposure would result in a greater percentage of cultchless and not cemented spat, as shown in Figure 2a.

A large proportion of the cultivated oyster is cultured using the method of strings of shells and it is in these systems that L-Dopa has its main application. Settlement can be stimulated using the materials which are most convenient for the aquaculturist, thus lowering the costs as no specific materials have to be acquired for this process. However, this fact could have complications in relation to obtaining attachments to unfavourable substrata.

Cooper (1983) tested the application potential of L-Dopa in systems of commercial seed production and found that, on using this compound, larvae did not show preference for any particular type of substratum, be it oyster shells or surfaces of the recipients used in the experiment.

The use of the three compounds to induce metamorphosis has the advantage of obtaining a high percentage of settlement in a short period of time. The large variation between the settlement percentages, which according to Krantz (1982) is one of the technical phenomena which preclude successful predictions, is in this case controlled by the inducers. Another advantage is that a homogeneous size of the spat is obtained when the larvae receive the stimulus in the same period of time and because the space normally assigned to the settling section in a laboratory is not needed, then this space can be used by nursery systems, thus increasing the production capacity.

An important point in the chemical stimulation of the larvae is the development which occurs afterwards. Coon *et al.* (1985) report that spats obtained in this way did not show differences in growth on being compared with spats which underwent natural settlement, at least during the first eight months of culturing.

espacio puede ser utilizado por sistemas de preengorda, aumentando así la capacidad de producción.

Un punto importante del estímulo químico de las larvas, es el desarrollo que presentan posteriormente. Coon *et al.* (1985), reportan 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 ocho meses de cultivo.

LITERATURA CITADA

Bonar, D.B. (1976). Molluscan metamorphosis: a study in tissue transformation. *Amer. Zool.*, 16: 573-591.

Buddecke, E. (1983). Elementos de Bioquímica. Ed. Omega S.A., Barcelona, pp. 341-345.

Coon, S.L., Bonan, D.B. and Weiner, R.M. (1985). Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by L-Dopa and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 94: 211-221.

Coon, S.L., Bonan, D.B. and Weiner, R.M. (1986). Chemical production of cultchless oyster spat using epinephrine and norepinephrine. *Aquaculture*, 58: 255-262.

Cooper, K. (1983). Potential for application of the chemical DOPA to commercial bivalve setting systems. *J. Shellfish Res.*, 3: 110-111 Abstract.

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.

Dupuy, J.L. (1973). Translation of mariculture research into a commercial oyster seed hatchery. *Marine Tech. Soc. 9th Annual Conference*, pp. 677-685.

Hadfield, M.G. (1977). Chemical interaction in larvae setting of a marine gastropod. In: D.J. Faulker and W.H. Fenical (eds.), *Marine Natural Products Chemistry*. Plenum Press, New York, pp. 403-414.

English translation by Christine Harris.

Hadfield, M.G. (1984). Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. *Aquaculture*, 39: 283-298.

Kempf, S.C. and Willows, A.B.O. (1977). Laboratory culture of the nudibranch *Tritonia diomedea* (Trinoniidae: 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.

McAnally, L.S. (1988). Evaluación y adaptación de rutinas para la producción de semilla suelta de ostión japonés *Crassostrea gigas* a nivel piloto. Tesis de Licenciatura, IIO-UABC, 139 pp.

Morse, D.E., Hooker, N., Duncan, H. and Jensen, L. (1979). 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.

Perron, F.E. and Turner, R.D. (1977). Development, metamorphosis and natural history of the nudibranch *Doridella obscura* (Corambidae: Opisthobranchia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 27: 171-185.

Scheltema, R.S. (1974). Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. *Thalassia Jugos.*, 10: 263-296.

Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry* (2nd edition). W.H. Freeman & Co., San Francisco, USA, 859 pp.

Vanderborgh, G.H. Jr. (1972). Commercial molluscan hatcheries and their problems. In: Progress in fishery and food science. University of Washington, College of Fish. Fiftieth Anniversary Celebration Symposium, R.W. Moore (ed.). Publications in Fisheries - New Series, Vol. V, 223 pp.

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).

Weiner, R.M., Segall, A.M. and Colwell, R.R. (1985). Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the eastern oyster). Appl. Environ. Microbiol., pp. 83-90.

Williams, G.B. (1964). The effect of extracts of *Fucus serratus* in promoting the settlement of larvae of *Spirobis borealis* (Polychaeta). J. Mar. Biol. Ass. U.K., 44: 397-414.