

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Variabilidad inter-individual e inter-familiar en tasa de crecimiento en *Ruditapes decussatus*

Autora:
Carmen Antolín Infante
Director:
Irrintzi Ibarrola Bellido

© 2019, Carmen Antolín Infante

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIAL Y METODOS	5
2.1 Obtención, clasificación y mantenimiento de los ejemplares experimentales	5
2.2 Diseño experimental	7
2.3 Determinación experimental de los parámetros fisiológicos	7
2.3.1 Consumo de oxígeno (VO_2 : $mlO_2 \cdot h^{-1}$)	7
2.3.2 Tasas de aclaramiento (CR : $L \cdot h^{-1}$)	8
2.4 Tratamiento estadístico	9
3. RESULTADOS	10
3.1 Consumo de oxígeno (VO_2)	10
3.2 Tasa de aclaramiento (CR)	14
4. DISCUSIÓN	18
4.1 Diferencias intra-familiares en el crecimiento	18
4.2 Diferencias inter-familiares en el crecimiento	20
5. CONCLUSIONES	21
6. BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

Se han analizado las diferencias inter-familiares e intra-familiares en los parámetros del balance energético en individuos juveniles pertenecientes a cuatro familias de la especie de almeja *Ruditapes decussatus*. Las familias se produjeron en el centro de investigación *Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA)* de San Carles de la Rápita (Tarragona) y se mantuvieron bajo condiciones idénticas durante un periodo, en el cual se logró una alta dispersión de tamaños (longitud de concha: de 1 a 12 mm). Muestras de estas familias se trasladaron al laboratorio, donde se clasificaron los individuos de cada familia en grupos de diferentes tamaños (tallas SS, S, M y L). Con esos individuos se realizaron análisis de los parámetros fisiológicos del balance energético: tasa de aclaramiento (CR) y consumo de oxígeno (VO_2), que representan los procesos de ganancia y pérdida de energía respectivamente. En tres de las familias, las tasas fisiológicas específicas (por unidad de masa) no fueron significativamente distintas entre individuos de diferentes tallas: el exponente de masa en las relaciones alométricas de CR y VO_2 con el tamaño corporal fue cercano a 1. Este resultado contrasta con los obtenidos en la generalidad de los análisis alométricos de las tasas fisiológicas en bivalvos. En el trabajo se han discutido las implicaciones que estos resultados tienen en la explicación de las diferencias intra-familiares en tasa de crecimiento. En una de las familias, el exponente de masa para CR (0,753) fue significativamente inferior al de VO_2 (1,184), lo que indica que la capacidad de filtrar se reduce con el tamaño corporal en mayor medida que en las otras familias. Este resultado explica las menores tallas halladas en esa familia con respecto a las otras.

ABSTRACT

The inter-family and intra-family differences have been analyzed by measuring the parameters of energy balance in juvenile individuals belonging to four families of the clam species *Ruditapes decussatus*. The families were produced in the *Agroalimentary Research and Technology Institute (IRTA)* research center of San Carles de la Rápita (Tarragona) and they were kept under identical conditions during a determined period, in which there was a high dispersion of sizes was obtained (shell-length: from 1 to 12 mm). Samples from these families were transferred to the laboratory where individuals from each family were sorted in groups of different sizes (SS, S, M and L). Those individuals were then subjected to measurements of the physiological parameters involved in the energy balance: clearance rate (CR) and oxygen consumption (VO_2), which stand for the energy gain and energy loss processes, respectively. In three of the families, the specific physiological rates (per unit mass) were not significantly different between individuals of different sizes: the mass exponent in the allometric ratios of body size with both CR and VO_2 was close to 1. This result contrasts with those obtained in the vast majority of the allometric analysis of the physiological rates in bivalves. In the present work we have discussed the implications that these results may have when understanding the existing intra-familial growth rate-differences. In one of the families, the mass exponent for CR (0,753) was significantly lower than that

of VO_2 (1,184), which indicates that the ability to filter is reduced with body size to a greater extent than in the other families. These results explain the smaller sizes found only in that family.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento es el aumento de tamaño o peso que experimenta un organismo, y es considerado un indicador del estado fisiológico general del individuo. La ganancia o pérdida de peso en un individuo viene determinada por el resultado de su balance energético, es decir, del balance entre la entrada de energía obtenida con el alimento ingerido y la pérdida de energía a través de los procesos de defecación, excreción y el mantenimiento de los procesos metabólicos. Por lo tanto, el crecimiento es una medida integradora de los diferentes procesos fisiológicos que ocurren en el interior del organismo (digestión, asimilación, respiración y excreción), y así, cualquier factor que interfiera con ellos ejercerá efectos significativos sobre el crecimiento. Los procesos de adquisición de energía de los bivalvos como los costes metabólicos están influenciados por el medio ambiente puesto que este condiciona, por un lado, el gasto de energía al que el organismo debe hacer frente, y por otro, la energía disponible (el alimento). En consecuencia, el balance energético y, por consiguiente, el crecimiento está influenciados por las condiciones ambientales.

En los moluscos bivalvos, las diferencias entre individuos en la tasa de crecimiento varían enormemente en poblaciones naturales (Mallet y Haley, 1983; Dickie et al., 1984; Brown, 1988), incluso cuando se exponen a condiciones ambientales idénticas. Dicha variación indica la existencia de diferencias inter-individuales de carácter endógeno en los procesos que determinan el balance energético: capacidad de adquirir energía (tasas de absorción) y el coste energético de los procesos metabólicos. Esto es, la diferenciación del crecimiento, además de por las variables exógenas, está también determinada por variables endógenas: genéticas o epigenéticas (Bayne, 1999a y 1999b; Toro et. al., 2004; Tamayo et. al., 2011).

Los bivalvos son organismos filtradores: la branquia es el órgano encargado de adquirir las partículas en suspensión y poder ingerir el alimento. El volumen de agua aclarado de partículas en suspensión por unidad de tiempo se conoce como tasa de aclaramiento (CR: l/h) y es uno de los principales parámetros fisiológicos que hace referencia a la obtención de energía. Como se ha mencionado anteriormente, la pérdida de energía puede darse mediante la excreción o el metabolismo, pero las pérdidas energéticas derivadas de la excreción son muy escasas comparadas con las del metabolismo, y por ese motivo, suelen excluirse en los estudios de fisiología energética (ver Bayne y Newell, 1983). El metabolismo es el conjunto de todas las reacciones químicas que tienen lugar en el organismo y en individuos aerobios se estima habitualmente a partir del consumo de oxígeno (VO_2), ya que el oxígeno es el último receptor de la cadena de electrones.

Debido a las notables diferencias de tamaño entre individuos, actualmente, se intenta entender porque se dan esas desigualdades en la tasa de crecimiento, y para ello, se utiliza la fisiología energética, comparando individuos de crecimiento rápido o tamaño superior (F: Fast grower) frente a los de crecimiento lento o tamaño inferior (S: Slow grower). Bayne et al. 1999a definió tres modelos para contextualizar las causas fisiológicas que producen la variabilidad inter-individual en el crecimiento:

1. Los individuos de crecimiento rápido (F) poseen una mayor capacidad filtradora, sin provocar una disminución en la eficiencia de absorción.
2. Los ejemplares F reducen los gastos del mantenimiento del organismo, en comparación con los individuos S.
3. Las diferencias en las tasas de crecimiento entre individuos F y S se basan en el diferente coste energético de la síntesis de tejido; es decir, los individuos de rápido crecimiento poseen menores costes de crecimiento.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, considerando que existen factores genéticos determinantes para el crecimiento, resulta interesante realizar estudios en los que se comparen la caracterización del rendimiento fisiológico dentro de una misma familia. De hecho, las familias resultan ser un excelente material biológico para probar la base genética de las diferencias, ya que, siendo hermanos, comparten la mayor igualdad posible en su carga genética.

El presente estudio ha tenido como objetivo identificar los parámetros fisiológicos responsables de la existencia de diferencias en la capacidad de crecimiento en juveniles de almeja fina (*Ruditapes decussatus*). En España esta especie es la más apreciada para su consumo, siendo la que mayor precio alcanza en el mercado. Por esta razón, las diferencias inter-familiares e intra-familiares de esta almeja constituyen un fenómeno biológico de gran interés para la acuicultura, ya que ofrece un amplio margen para la implementación de procesos de mejora de la productividad. Para este estudio se han utilizado 4 familias de almeja fina que fueron creadas en un evento de fecundación y se mantuvieron en el laboratorio en condiciones ambientales idénticas. Las diferencias se han analizado en dos niveles distintos de relación: comparando cuatro familias diferentes constituidas por hermanos (diferencias inter-familiares) y comparando las diferencias inter-individuales entre hermanos dentro de cada una de esas familias (diferencias intra-familiares).

Para analizar el rendimiento fisiológico de las diferentes progenies de la especie en los dos niveles mencionados, se ha utilizado un enfoque alométrico. La alometría es el estudio de la relación entre el tamaño corporal y la forma, anatomía, fisiología y, finalmente, el comportamiento (Damuth, 2001). Las relaciones alométricas describen la escala metabólica y se expresan típicamente como $Y = a \cdot LW^b$, donde Y es la variable fisiológica, a representa la constante de proporcionalidad (la elevación), LW es la masa corporal (peso vivo) y b representa el exponente de masa (la pendiente), el factor con el que la

variable fisiológica escala con el incremento del tamaño corporal. Es importante saber que la ley de Kleiber (1932) afirma, y una prolongada bibliografía (ver revisión de Glazier 2018) corrobora, que generalmente el metabolismo basal de los animales muestra una alometría negativa, con una potencia de 0,75 aproximadamente. Esto es, que cuando el animal aumenta de tamaño el metabolismo, por unidad de masa, disminuye.

El presente estudio ha tenido concretamente dos objetivos:

1. Identificar los parámetros fisiológicos responsables de la existencia de diferencias en el potencial de crecimiento entre familias de almejas (diferencias inter-familiares).
2. Identifica los parámetros fisiológicos responsables de la existencia de diferencias en el potencial de crecimiento entre las almejas hermanas individuales (diferencias intra-familiares).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Obtención, clasificación y mantenimiento de los ejemplares experimentales

En el presente estudio se han utilizado 4 familias de la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), denominadas F1, F2, F3 y F4. Las familias están constituidas por el conjunto de descendientes resultantes del cruzamiento de una pareja de ejemplares reproductores. Se produjeron en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) de San Carles de la Rápita en el marco del proyecto de investigación MINECOR 2017 *Fisiología y Genética del crecimiento de almejas de interés comercial* en el que participan además el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC) de Castellón y el grupo de investigación Fisiología Energética de Moluscos Bivalvos de la UPV/EHU. Para la producción de familias, los ejemplares reproductores se sometían a un brusco cambio térmico para la estimulación de la freza o liberación de gametos. Los oocitos y el esperma liberado de cada reproductor se recogían separadamente con la ayuda de pipetas Pasteur de plástico y posteriormente se producía la fertilización de los gametos en tanques de cultivo larvario que disponen de agua de mar corriente termostalizada y continuo flujo de microalgas para la alimentación de las larvas. Una vez que las larvas maduras se hubieron fijado (tras la metamorfosis), los juveniles o semillas resultantes se trasladaban a tanques de cultivo de juveniles.

Para la realización de este estudio se recibieron muestras de juveniles de las cuatro familias producidas en el IRTA. Las muestras contenían un número indeterminado de juveniles que cubrían todo el rango de distribución de tamaño (longitud de concha: de 0,5 a 12mm aproximadamente). Dado que los juveniles se produjeron en el mismo momento, las diferencias de talla son el resultado de la existencia de diferencias inter-individuales en la tasa de crecimiento.

El objetivo de este experimento ha sido el de analizar las posibles bases fisiológicas de las diferencias inter-familiares e intra-familiares en la tasa de crecimiento de la especie *R. decussatus*. Para ello, se ha optado por una aproximación experimental que incluyera la determinación de las relaciones alométricas de los parámetros fisiológicos, las cuales determinan el balance energético con el tamaño corporal, y debido a eso, se ha tratado de cubrir el mayor rango posible de tallas. Por esta razón, cuando las familias fueron entregadas al laboratorio, se hizo una clasificación por tamaños. Para efectuar la separación de tamaños se emplearon 4 tamices de distinta luz de malla (8mm, 5mm, 2mm y 1mm) y así se obtuvieron 5 tallas en cada familia:

1. Talla L: individuos de longitud de concha superior a 8mm.
2. Talla M: individuos cuya longitud de concha se situaba entre 5 y 8mm.
3. Talla S: individuos de longitud de concha entre 2 y 5mm.
4. Talla SS: individuos cuya longitud de concha se situaba entre 1 y 2 mm.
5. Talla SSS: individuos de longitud de concha inferior a 1mm.

En esta última talla (SSS) se calculó la tasa de mortalidad (TM) para considerar si los animales eran viables a la hora de realizar experimentos de energética fisiológica. Este cálculo se efectuó porque los investigadores del IRTA habían observado una elevada mortalidad en los individuos de dicho tamaño. Para ello, se seleccionaban al azar 50 ejemplares y se cuantificaba mediante observación al microscopio cuantas almejas estaban vivas. Es decir, se cuantificaba cuantos de los animales tenían los sifones o/y pie expuestos y si mostraban respuesta al tocarlos. Una vez efectuado el conteo por duplicado, se concluyó que la mortalidad era superior al 50% en todas las familias exceptuando en la familia F4, por lo que se tuvieron que retirar todos los grupos salvo el de esta última familia.

Una vez clasificadas por tamaño, se realizó una medición del peso vivo medio individual (Tabla 1) para examinar las diferencias inter-familiares e intra-familiares.

	F1	F2	F3	F4
L	577,1	347,2±2,7	451,32±30,39	428,3
M	264,6± 28,99	183,13±13,92	298,55±28,54	132,53±13,51
S	53,23± 8,19	44,12±7,05	37,79±6,76	43,13±7,65
SS	6,08± 0,41	6,49±0,88	6,2± 0,8	3,74 ±0,35

Tabla 1. Peso vivo medio (mg) individual de las cuatro tallas de almejas (L, M, S y SS) de cada familia. Para el grupo L de las familias 1 y 4 no hay ±SE porque están formados por un único ejemplar.

Después de efectuar la clasificación por tamaños, las almejas se mantuvieron durante 3 meses en el laboratorio en recipientes de vidrio que se mantenían en tanques de agua de mar (30l) con aireación persistente, termostatación (20°C) y continua administración de alimento con la ayuda de bombas

peristálticas de flujo regulable. De esta manera, todas las familias y tallas estuvieron en idénticas condiciones de alimentación. El flujo de alimento se ajustaba frecuentemente a la demanda para mantener una concentración constante de partículas en los tanques ($20.000 \text{ partículas.ml}^{-1}$). Esta concentración se medía con un equipo Coulter Multisizer 3 en muestras de agua tomadas de los tanques. La dieta consistía en células de la microalga *Isochrysis galbana* obtenida de cultivos producidos continuamente en el laboratorio; por lo tanto, a su vez, en esos 3 meses, se tuvo que cultivar y mantener los cultivos de microalga.

2.2 Diseño experimental

Para el análisis de las bases fisiológicas de las diferencias inter-familiares e intra-familiares de la tasa de crecimiento, en este estudio se ha optado por determinar la relación alométrica de los parámetros fundamentales del balance energético con el tamaño corporal. La tasa de pérdida de energía, es decir, la tasa metabólica de rutina, se estimó mediante la realización de respirometrías para el cómputo del consumo de oxígeno (VO_2). La incorporación de energía o tasa de alimentación se calculó mediante la determinación de la tasa de aclaramiento (CR) o volumen de agua depurado de partículas por unidad de tiempo.

Para el cómputo de las tasas fisiológicas se utilizaron 5 muestras ($n=5$) por cada talla y familia. Debido al reducido tamaño de los ejemplares experimentales, las determinaciones de las tasas fisiológicas sólo pudieron hacerse de manera individualizada con las almejas de talla L (los de mayor tamaño); para el resto de tamaños, las determinaciones se realizaron con grupos de individuos. Debido a las grandes diferencias entre tallas, se determinó previamente el número de individuos que se utilizaría para crear los grupos, y así poder lograr una biomasa similar en las muestras. El número de individuos seleccionado para trabajar con las almejas de talla SS fue alrededor de 120 por muestra, de talla S entre 15 y 25 individuos por muestra, y de la talla M, entre 3 y 6 aproximadamente.

Después de seleccionar el número de ejemplares necesarios para las muestras, se extraían al azar los individuos experimentales del tanque de alimentación y se transferían a los respirómetros o a las cámaras de filtración para determinar el consumo de oxígeno o tasa de aclaramiento respectivamente. Una vez finalizada la determinación de los parámetros, se devolvían las almejas a los tanques.

2.3 Determinación experimental de los parámetros fisiológicos

2.3.1 Consumo de oxígeno (VO_2 : $\text{mlO}_2.\text{h}^{-1}$)

Para la determinación del consumo de oxígeno los individuos experimentales se confinaban en respirómetros que consistían en tubos FalconTM de 50mL, sellados con sondas de oxígeno conectados a oxímetros (HATCH HQ40d). El descenso en la concentración de oxígeno disuelto se midió durante un

periodo aproximado de 4 horas. Al final de este periodo se homogenizaba el agua de los tubos para medir la concentración final de oxígeno. Se utilizaron respirómetros control (tubos FalconTM sin almejas) para verificar la estabilidad de la concentración de oxígeno durante el período de medición. Los respirómetros se mantenían en un baño de agua termostatzado a 21°C.

Después de lograr las concentraciones de oxígeno inicial y final en el agua, se calculó la pendiente de la diferencia entre ellas (b_{i-f}). El consumo de oxígeno experimental (VO_{2exp}) se calculó según la siguiente expresión:

$$VO_{2exp} = (b_{i-f} - b_{control}) \cdot V_a - 0,7 \text{ml.mg}^{-1} \cdot 60 \text{min.h}^{-1}$$

Donde $b_{control}$ es la pendiente del control; V_a el volumen de agua de mar en el respirómetro; $0,7$ la conversión de mililitro a miligramo y 60 la conversión de minutos a horas.

Una vez determinado el consumo de oxígeno de la muestra, se procedió a estimar el consumo de oxígeno individual dividiendo el valor obtenido por el número de individuos en el respirómetro. Esto se calculó para las muestras formadas por un conjunto de individuos; es decir, se estimó para todas las tallas salvo para las almejas de talla L cuya determinación era individual.

2.3.2 Tasas de aclaramiento (CR: $L.h^{-1}$)

La tasa de aclaramiento de las almejas (CR) se determinó de acuerdo con la expresión de Crisp (1971):

$$CR = \frac{f \cdot [(Cc - Ca) / Cc]}{n}$$

Donde f es el flujo de agua a través de la cámara experimental ($l.h^{-1}$), Cc y Ca son las concentraciones de partículas ($part.l^{-1}$) en las salidas de la cámara control y experimental respectivamente y n es el número de individuos utilizados en la determinación.

Para ello, las almejas se introducían en recipientes o cámaras de filtración que consisten en botellas de vidrio ISO (50 ml), cuya tapa estaba doblemente perforada para la disposición de flujos de entrada y salida de agua de mar (ver Imagen 1). El suministro de agua con las células de fitoplancton a los recipientes se llevaba a cabo bombeando agua de un stock, al que se le añadía fitoplancton, mediante una bomba peristáltica multicanal. La bomba peristáltica regulaba el flujo, el cual se modificaba para mantener una reducción de concentración de partículas entre entrada y salida que se situara en el rango 15-40%. La concentración de partículas en la salida de la cámara control (Cc) y las salidas de las cámaras de los animales (Ca) se tomaban cada hora durante un periodo de 7-8 horas con un contador de partículas (Z1 Coulter).

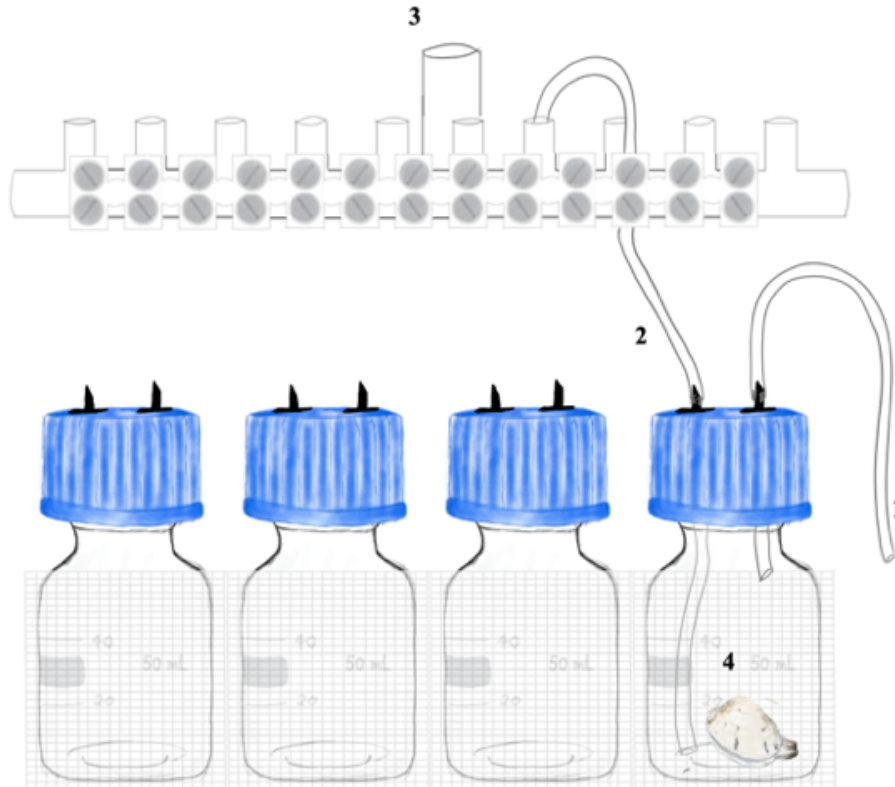


Imagen 1. Método utilizado para la medición de la tasa de aclaramiento. Los números 1 y 2 representan los tubos de salida y entrada respectivamente, el número 3 la bomba peristáltica multicanal y el número 4 una cámara de filtración.

Una vez calculadas todas las CR del seguimiento, se observó cuales estaban dentro del rango de reducción establecido (15%-40%) y con los valores adecuados se calculó la media de la tasa de aclaramiento.

2.4 Tratamiento estadístico

Después de calcular el consumo de oxígeno y la tasa de aclaramiento, se calculó la relación alométrica de ambas variables fisiológicas con el peso vivo (LW) de acuerdo con la expresión:

$$Y = a \cdot LW^b$$

donde Y es la variable fisiológica (VO_2 : $mlO_2 \cdot h^{-1}$ o CR : $l \cdot h^{-1}$), LW es el peso vivo del individuo (g), b representa el exponente de masa (el factor con el que la variable fisiológica escala con el incremento del tamaño corporal) y a es la constante de proporcionalidad (representa el valor de la variable fisiológica Y , independiente del tamaño).

La práctica habitual para calcular el valor de a y b consiste en computar la regresión lineal de la transformación logarítmica de las variables:

$$\text{Log } Y = b \cdot \text{log } LW + \text{log } a$$

Por un lado, la pendiente de estas regresiones (b) será la que indique el tipo de relación que hay entre las dos variables, ya que cuando $b = 1$ la relación entre las dos variables es isométrica, es decir, la tasa fisiológica aumenta de manera estrictamente proporcional al incremento del tamaño corporal y, por tanto, la tasa fisiológica específica de peso no varía con el tamaño corporal. Sin embargo, cuando el exponente es menor que 1, se considera alometría negativa, en otras palabras, el valor de la tasa fisiológica aumenta en menor medida que el peso corporal; es decir, la tasa fisiológica específica de peso se reduce conforme aumenta el tamaño del individuo. Si el exponente alométrico es mayor de lo esperado ($b > 1$), se dice que la alometría es positiva, es decir, hay un crecimiento desproporcionadamente alto de la variable y , por consiguiente, la tasa específica de peso aumenta con el incremento del tamaño del individuo. Por otro lado, la elevación de la regresión será la que indique cual es el valor de la tasa fisiológica para un tamaño determinado.

Una vez calculadas las relaciones alométricas de ambas variables para cada una de las familias, se realizó una ANCOVA (análisis de la covarianza) para poder testar las existencias de diferencias inter-familiares en las pendientes (b) y elevaciones (a), y para ello se siguió el procedimiento descrito en *Biostatistical Analysis* (J.H. Zar, 1996). Primero, se llevó a cabo el análisis de diferencias significativas en las pendientes y en el caso en el que H_0 se rechazaba, es decir, en el que las pendientes no eran iguales, se examinaba cual(es) era(n) la(s) diferente(s), y para ello se realizaron test de Tukey (test de comparación múltiple de pendientes), en el cual el estadístico utilizado es q . En el caso en el que las pendientes eran iguales (H_0 aceptada) se calculó la pendiente común y posteriormente, se procedió a realizar un test de elevaciones, utilizando el estadístico F , para analizar si estas eran iguales o no. Si el resultado de este último test era que las elevaciones eran diferentes, se comprobaba cual(es) era(n) la(s) diferente(s), y para ello se realizó otro test de Tukey (test de comparación múltiple de elevaciones), en el cual el estadístico utilizado es q .

3. RESULTADOS

3.1 Consumo de oxígeno (VO_2)

Los consumos de oxígeno obtenidos por los individuos de diferentes tallas de cada familia se representan en la Tabla 2.

Familia	Talla	Descripción muestra	Biomasa total (mg)	n	VO_2 t ($\mu\text{l O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$)	VO_2 ind. ($\mu\text{l O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$)	VO_2 spc. ($\text{ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
F1	SS	1	881	94	17,892	0,19	0,020
		2	914,1	102	17,262	0,169	0,019
		3	869,6	118	21,168	0,179	0,024
		4	896,4	117	20,538	0,176	0,023
		5	839,7	97	21,42	0,221	0,026

		1	1573,2	20	24,562	1,228	0,016	
		2	1680,2	20	36,729	1,836	0,022	
	S	3	1694,7	20	21,672	1,084	0,013	
		4	1328,4	20	16,216	0,811	0,012	
		5	1663,3	20	32,277	1,614	0,019	
		1	1447,1	6	34,793	5,799	0,024	
		2	1361,1	6	53,676	8,946	0,039	
	M	3	1258	6	39,984	6,664	0,032	
		4	1504	6	23,058	3,843	0,015	
		5	1533,5	6	18,06	3,01	0,012	
	L	1	926,9	1	38,485	38,485	0,042	
		1	1085,2	112	19,992	0,179	0,018	
		2	1308,2	117	18,85	0,161	0,014	
	SS	3	1331,2	120	25,364	0,211	0,019	
		4	953,3	110	14,843	0,135	0,016	
		5	1368,1	121	13,759	0,114	0,01	
		1	1281,2	20	20,962	1,048	0,016	
		2	1272,7	20	6,678	0,334	0,005	
	S	3	1088,1	20	12,096	0,605	0,011	
F2		4	1069,6	15	15,103	1,007	0,014	
		5	1067,4	20	9,072	0,454	0,008	
		1	1145,2	6	57,456	9,576	0,05	
		2	1630,3	6	23,625	3,938	0,014	
	M	3	1630,8	6	47,04	7,84	0,029	
		4	1441,4	6	25,2	4,2	0,017	
		5	1422,3	6	32,432	5,405	0,023	
		1	537,9	1	13,929	13,929	0,026	
	L	2	538,8	1	32,81	32,81	0,061	
		1	850,2	111	14,364	0,129	0,017	
	F3	SS	2	1145,3	126	11,567	0,092	0,01
			3	985,6	130	22,176	0,171	0,023
			4	956,7	122	18,018	0,148	0,019

		5	968,2	129	21,05	0,163	0,022
		1	973,7	20	29,232	1,462	0,03
		2	864,5	20	24,595	1,23	0,028
	S	3	1225	20	18,278	0,914	0,015
		4	965,2	20	23,15	1,158	0,024
		5	1152,3	20	14,192	0,71	0,012
		1	1211,5	4	32,928	8,232	0,027
		2	1134,6	4	24,948	6,237	0,022
	M	3	1168,3	3	30,744	10,248	0,026
		4	1312,7	4	31,046	7,762	0,024
		5	1072,9	5	11,288	2,258	0,011
		1	1180,7	2	33,579	16,79	0,028
	L	2	1196,2	2	37,233	18,617	0,031
		3	1207,1	2	31,84	15,92	0,026
		1	909,3	180	17,766	0,099	0,02
		2	906,4	180	14,713	0,082	0,016
	SS	3	909,1	180	26,75	0,149	0,029
		4	919,2	180	18,144	0,101	0,02
		5	853,1	180	11,575	0,064	0,014
		1	1244	20	23,058	1,153	0,019
		2	1100,6	20	35,078	1,754	0,032
	S	3	1303,7	20	29,232	1,462	0,022
		4	1047,7	20	20,702	1,035	0,02
		5	1144,3	22	39,64	1,802	0,035
		1	1076,9	6	24,604	4,101	0,023
		2	928,7	6	32,004	5,334	0,034
	M	3	973	6	31,248	5,208	0,032
		4	1309,6	3	41,126	13,709	0,031
		5	1076,2	3	60,883	20,294	0,057
	L	1	521,9	1	37,825	37,825	0,072

Tabla 2. Resultados del consumo de oxígeno total (VO_2 t), individual (VO_2 ind.) y específico (VO_2 spc.) para todas las tallas y familias. La tabla incluye la biomasa total y número de individuos (n) utilizados para la determinación de este parámetro.

Con los resultados mostrados en las tablas se procedió a calcular la relación alométrica del consumo de oxígeno con el tamaño corporal (peso vivo). Las ecuaciones de las regresiones lineales de las variables transformadas logarítmicamente se muestran en la Tabla 3 y se han graficado en la Figura 1. Todas las relaciones muestran una alta significación estadística (ver en la Tabla 3). Los exponentes de masa (pendientes, b) obtenidos para las cuatro familias son similares y tienen un valor próximo a 1.

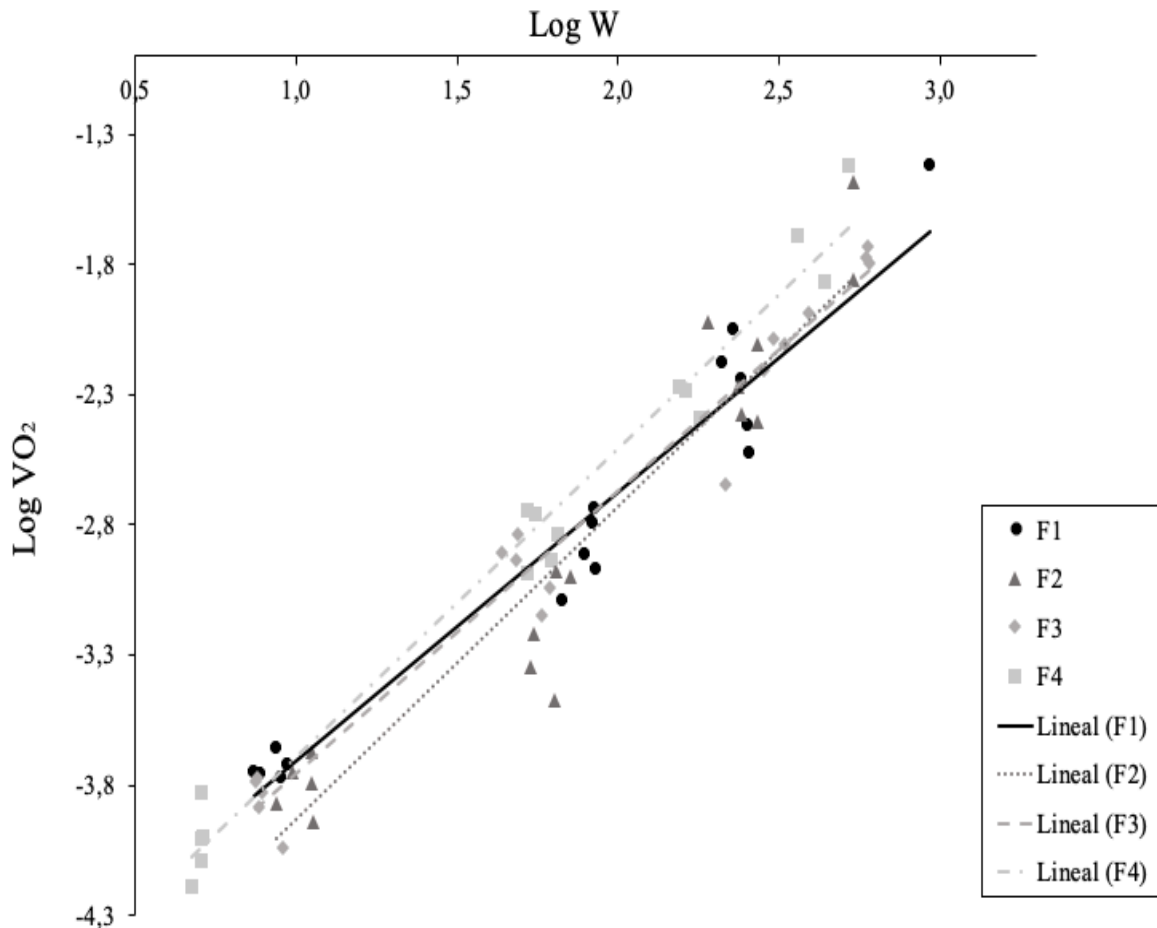


Figura 1. Relación alométrica de el consumo de oxígeno con el peso vivo para las cuatro familias de *Ruditapes decussatus*.

Familias	n	a (\pm SD)	b (\pm SD)	R ²	p	F
1	16	-4,741 (\pm 0,125)	1,033 (\pm 0,065)	0,948	<0,0001	253,766
2	17	-5,130 (\pm 0,179)	1,201 (\pm 0,092)	0,919	<0,0001	170,380
3	18	-4,837 (\pm 0,097)	1,083 (\pm 0,048)	0,969	<0,0001	503,931
4	16	-4,880 (\pm 0,087)	1,184 (\pm 0,048)	0,978	<0,0001	613,575

Tabla 3. Relación alométrica para el consumo de oxígeno con el peso individual, según la expresión $Y = a \cdot LW^b$

Posteriormente, se elaboró un análisis de la covarianza (ANCOVA) en el que primero se desarrolló un test de pendientes para observar si había diferencias estadísticamente significativas entre ellas. El resultado fue que las pendientes no eran significativamente distintas ($F=1,5096$; $df=3, 59$; $p>0,05$), y por ello, se calculó una pendiente común (b_c), cuyo valor es de $1,124 (\pm 0,034)$.

Después, se procedió a analizar la posible existencia de diferencias significativas en la elevación de las regresiones. El análisis mostró que había diferencias significativas ($F=2,9134$; $df=3, 47$; $p<0,05$). Como existían diferencias entre las elevaciones, se realizó un test de Tukey para hacer una comparación múltiple entre elevaciones. Se observaron diferencias significativas entre la segunda y cuarta familia ($F1$ vs $F2$: $q=1,6447$; $df=3, 35$; $p>0,05$; $F1$ vs $F3$: $q=0,0930$; $df=3, 35$; $p>0,05$; $F1$ vs $F4$: $q=2,4270$; $df=3, 35$; $p>0,05$; $F2$ vs $F3$: $q=1,5182$; $df=3, 35$; $p>0,05$; **$F2$ vs $F4$: $q=4,3689$; $df=3, 35$; $p<0,05$** ; $F3$ vs $F4$: $q=2,7344$; $df=3, 35$; $p>0,05$).

3.2 Tasa de aclaramiento (CR)

Las tasas de aclaramiento obtenidas por los individuos de diferentes tallas de cada familia se representan en la Tabla 4.

Familia	Talla	Descripción muestra	Biomasa total (mg)	n	CR t (ml.h ⁻¹)	CR ind. (ml. h ⁻¹)	CR spc. (l. h ⁻¹ .g ⁻¹)
F1	SS	1	875,4	113	214,700	1,900	0,245
		2	851,7	114	161,357	1,415	0,189
		3	858	117	234,415	2,004	0,273
		4	850,4	94	170,425	1,813	0,200
		5	871,1	96	283,959	2,958	0,326
	S	1	878,8	14	369,088	26,363	0,420
		2	867,2	11	169,776	15,434	0,196
		3	854,8	12	235,039	19,587	0,275
		4	825,4	8	288,257	36,032	0,349
		5	856,6	9	109,530	12,170	0,128
	M	1	864,5	2	210,756	105,378	0,244
		2	899,5	3	310,392	103,464	0,345
		3	809,9	3	288,378	96,126	0,356
		4	849,1	4	430,015	107,504	0,506
		5	849,1	3	318,640	106,213	0,375
L	1	884,6	1	422,391	422,391	0,477	

		1	1130,1	114	411,504	3,610	0,364
		2	968,6	118	421,306	3,570	0,435
	SS	3	1372,9	127	545,163	4,293	0,397
		4	1328,4	120	546,299	4,552	0,411
		5	1365,8	121	528,443	4,367	0,387
F2		1	869	15	227,522	15,168	0,262
		2	850,3	20	171,706	8,585	0,202
		3	839,8	14	121,759	8,697	0,145
	S	4	861,1	19	152,239	8,013	0,177
		5	849,1	14	65,841	4,703	0,078
		1	872,5	3	349,887	116,629	0,401
		2	848,5	3	322,065	107,355	0,380
	M	3	826,6	3	401,537	133,846	0,486
		4	852	3	376,587	125,529	0,442
		5	863,4	5	274,824	54,965	0,318
	L	1	535,6	1	397,086	397,086	0,741
		2	537,3	1	162,070	162,070	0,302
		1	1078,2	124	243,903	1,967	0,226
		2	985,4	124	136,795	1,103	0,139
	SS	3	1159,8	123	199,030	1,618	0,172
		4	1009,5	128	115,450	0,902	0,114
		5	835,2	107	158,533	1,482	0,190
F3		1	913,7	9	93,331	10,370	0,102
		2	1113,8	10	115,871	11,587	0,104
		3	998,7	11	93,394	8,490	0,094
	S	4	1069	25	253,383	10,135	0,237
		5	1234,2	26	364,848	14,033	0,296
		1	976,4	3	381,900	127,300	0,391
		2	1043,5	3	344,870	114,957	0,330
	M	3	987,6	3	85,649	28,550	0,087
		4	1090,4	3	184,746	61,582	0,169
		5	1012,3	2	163,287	81,644	0,161

		1	486,6	1	58,902	58,902	0,121
		2	590,5	1	126,100	126,100	0,214
	L	3	551,7	1	151,700	151,700	0,275
		4	592,1	1	131,000	131,000	0,221
		5	763,1	1	93,655	93,655	0,123
<hr/>							
		1	474,7	120	258,104	2,151	0,544
		2	604,6	120	472,940	3,941	0,782
	SS	3	454,8	121	265,809	2,197	0,584
		4	625,9	120	387,773	3,231	0,620
		5	501,2	120	252,141	2,101	0,503
<hr/>							
		1	1612,1	26	612,941	23,575	0,380
		2	1433,2	26	408,956	15,729	0,285
	S	3	1586,8	26	371,423	14,285	0,234
F4		4	1401,8	26	249,478	9,595	0,178
		5	1481,4	26	369,658	14,218	0,250
<hr/>							
		1	1309,6	3	155,214	51,738	0,119
		2	935,9	3	460,679	153,560	0,492
	M	3	768,4	3	238,447	79,482	0,310
		4	753,6	3	89,721	29,907	0,119
		5	897,7	4	287,847	71,962	0,321
<hr/>							
	L	1	523,9	1	75,485	75,485	0,144

Tabla 4. Resultados de la tasa de aclaramiento total (CR t), individual (CR ind.) y específico (CR spc.) para todas las tallas y familias. La tabla incluye la biomasa total y número de individuos (n) utilizados para la determinación de este parámetro.

Con los resultados mostrados en las tablas se procedió a calcular la relación alométrica de la tasa de filtración (CR) con el tamaño corporal (peso vivo). Las ecuaciones de las regresiones lineales de las variables transformadas logarítmicamente se muestran en la Tabla 5 y se han graficado en la Figura 2. Todas las relaciones muestran una alta significación estadística (ver en la Tabla 5). En este caso, no se observa que los exponentes de masa (pendientes, b) obtenidos para las cuatro familias sean iguales, siendo el de la cuarta (F4) el diferente, mostrando entre las familias el valor mínimo (0,753 ($\pm 0,057$)).

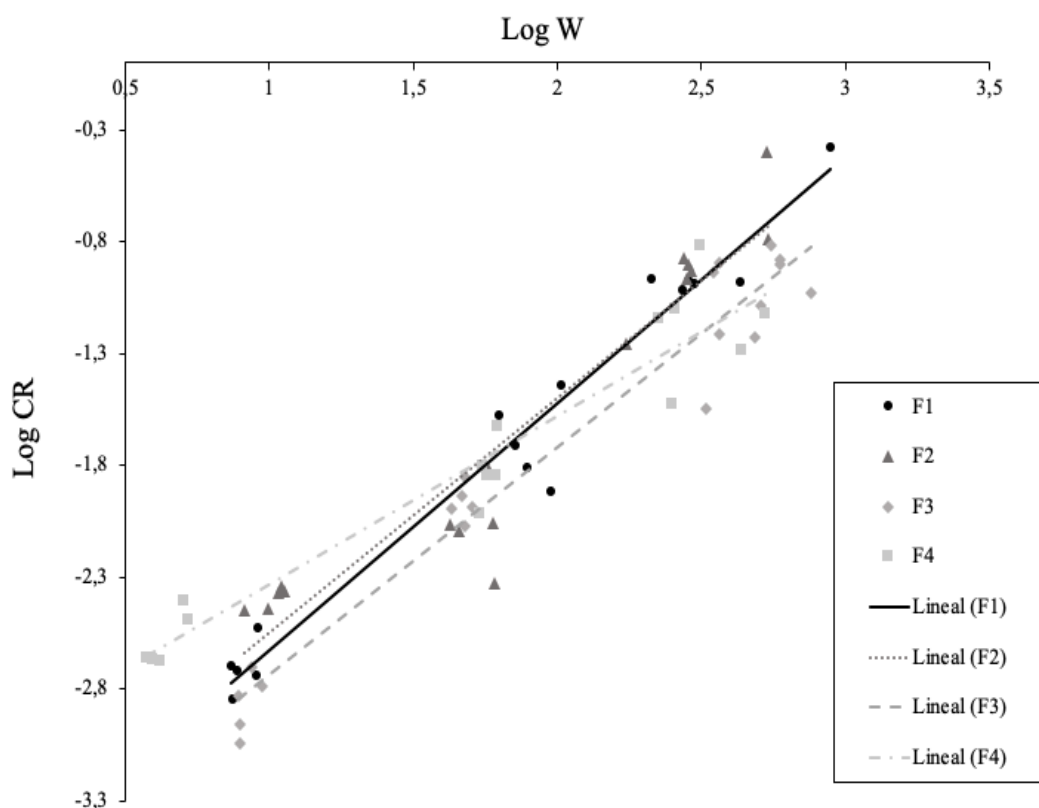


Figura 2. Relación alométrica de la tasa de aclaramiento con el peso vivo para las cuatro familias de *Ruditapes decussatus*.

Familia	n	a (\pm SD)	b (\pm SD)	R ²	p	F
1	16	-3,729 (\pm 0,106)	1,103 (\pm 0,054)	0,967	<0,0001	414,245
2	17	-3,602 (\pm 0,176)	1,052 (\pm 0,091)	0,900	<0,0001	134,474
3	20	-3,748 (\pm 0,106)	1,014 (\pm 0,050)	0,958	<0,0001	413,726
4	16	-3,086 (\pm 0,106)	0,753 (\pm 0,057)	0,926	<0,0001	175,089

Tabla 5. Relación alométrica para la tasa de aclaramiento con el peso individual, según la expresión $Y = a \cdot LW^b$

Al igual que con el consumo de oxígeno, se elaboró un análisis de la covarianza (ANCOVA) en el que se realizó un test de pendientes para observar si había diferencias estadísticamente significativas entre ellas. En este caso, el resultado fue que las pendientes eran significativamente diferentes ($F=6,3891$; $df=3, 61$; $p<0,05$) por lo que, se procedió a comparar las pendientes por pares. Para ello, se realizó un test de Tukey y se observó que la familia 4 era diferente al compararla con las demás ($F1$ vs $F2$: $q=0,7271$; $df=3, 61$; $p>0,05$; $F1$ vs $F3$: $q=1,4371$; $df=3, 61$; $p>0,05$; **$F1$ vs $F4$: $q=5,5127$; $df=3, 61$; $p<0,05$** ; $F2$ vs $F3$: $q=0,6015$; $df=3, 61$; $p>0,05$; **$F2$ vs $F4$: $q=4,5706$; $df=3, 61$; $p<0,05$** ; $F3$ vs $F4$: **$q=4,5268$; $df=3, 61$; $p<0,05$**).

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio ha sido analizar la existencia de diferencias inter-individuales en tasa de crecimiento y en los componentes fisiológicos del balance energético en semillas de almeja *Ruditapes decussatus* a dos niveles de proximidad genética distinta: entre hermanos (diferencias intra-familiares) y entre individuos de distintas familias (diferencias inter-familiares). Se han cuantificado los componentes fisiológicos de almeja pertenecientes a cuatro familias. A pesar de las dificultades metodológicas que se presentaron para la realización de determinaciones fisiológicas con individuos de tamaño pequeño, se ha preferido emplear almejas juveniles debido a que en esta fase se registra la mayor variabilidad en tasas de crecimiento entre individuos; de hecho, algunos de ellos pueden no llegar a la fase adulta.

4.1 Diferencias intra-familiares en el crecimiento

En este estudio, las almejas analizadas han presentado diferencias intra-familiares significativas en el crecimiento. Tan pronunciadas son estas diferencias que, siendo individuos de la misma edad, misma familia y criados en condiciones ambientales idénticas, han podido diferenciarse según la longitud de concha, hasta 4 tallas (L, M, S y SS), siendo la talla L 12 veces más grande que la talla SS. Además, se han podido observar ejemplares 100 veces superiores en peso vivo con respecto a los individuos más pequeños de dicha familia (ver tabla 1). Estas diferencias tan elevadas en tamaño, en animales que nacieron el mismo día, indican diferencias de crecimiento e ilustran el profundo impacto que pueden tener los factores endógenos (genéticos o epigenéticos) en el crecimiento de los bivalvos (Toro et al. 1996; Toro and Vergara, 1998; Bayne et al., 1999a, 1999b; Bayne, 2000, 2004; Pace et al., 2006).

A partir de la extensa bibliografía sobre las relaciones alométricas de CR y VO_2 en poblaciones naturales de bivalvos (véase, por ejemplo, las siguientes revisiones: Benard, 1983; Bayne y Newell, 1983; Ibarrola et. al., 2008, 2012), se pueden extraer 2 conclusiones principales:

1. El exponente de masa (b) es específico de cada especie, no depende de valores exógenos, y normalmente presenta un valor menor que 1. Esto indica que las tasas fisiológicas específicas, es decir, expresadas por unidad de peso, disminuyen a medida que el tamaño del organismo aumenta.
2. Los exponentes de masa para la tasa de aclaramiento son generalmente menores que los del consumo de oxígeno. Comúnmente los exponentes de masa para la tasa de filtración (CR) se encuentran entre 0,5 y 0,7 mientras que los exponentes de masa para el VO_2 se sitúan entre 0,6 y 0,8. Esto indica que, en términos de tasas por unidad de masa, el incremento del tamaño corporal provoca una reducción más pronunciada de la actividad de filtración que de la actividad metabólica. De este modo, cuanto mayor es el tamaño corporal menor es el balance energético

que puede alcanzar el organismo y, en consecuencia, la tasa de crecimiento se va reduciendo progresivamente, llegando el individuo a su talla o tamaño máximo.

Respecto al consumo de oxígeno (Figura 1), todos los exponentes de masa tienen el valor de 1 aproximadamente, por lo tanto, la relación entre las dos variables es isométrica; es decir, la tasa del metabolismo cambia de manera proporcional al peso. En otras palabras, tanto las almejas de crecimiento rápido (las de mayor tamaño o F) como las de crecimiento lento (las de menor tamaño o S) consumen la misma cantidad de oxígeno por gramo de peso vivo. Estos resultados se contraponen a los obtenidos en los estudios anteriormente mencionados, así como a las reglas básicas de la alometría, ya que lo esperado sería obtener una pendiente menor a 1 y próxima a 0,6-0,75. Los resultados logrados, por lo tanto, indican que o las almejas F tienen una tasa metabólica superior de la que les correspondería según su tamaño o que, por lo contrario, las almejas S tienen una tasa metabólica inferior de la que les correspondería según su tamaño.

Cabe destacar que las relaciones alométricas que se han medido en otros trabajos, mencionadas anteriormente, se calculan con individuos de muy distinto tamaño extraídos del entorno natural, donde, generalmente, las diferencias de tamaño están asociadas sobre todo a diferencias de edad. En nuestro caso, sin embargo, dicha relación se ha medido con individuos que presentan tamaños muy distintos, no por diferenciarse en edad, sino por tener distintas capacidades para crecer.

Examinando la tasa de aclaramiento (Figura 2) se puede observar que, al igual que en el consumo de oxígeno, las pendientes de casi todas las familias tienen aproximadamente el valor de 1, por lo que la relación entre la tasa de filtración y el peso también es isométrica; esto es, las almejas de crecimiento rápido y las de crecimiento lento aclaran lo mismo por gramo de peso vivo. Por lo tanto, en este caso tampoco se obtiene el resultado habitual de los análisis alométricos convencionales (valor de la pendiente <1).

Asimismo, puede observarse como, al contrario de lo que se ha observado en otros estudios, en las almejas de este trabajo el exponente de masa de la tasa de aclaramiento no es menor que el del consumo de oxígeno, si no que es igual ($b \approx 1$). Esto significa que la capacidad de adquirir energía (CR) no disminuye comparativamente más que el gasto metabólico (VO_2) y, por consiguiente, mantienen la capacidad de crecimiento aun aumentando en peso vivo; en otras palabras, el balance energético es el mismo por unidad de masa con independencia del tamaño. En consecuencia, la tasa de crecimiento no se reducirá progresivamente y ese factor será el que produzca que los individuos de mayor tamaño (F) cada vez adquieran un tamaño superior que los individuos de tamaño inferior (S).

4.2 Diferencias inter-familiares en el crecimiento

En el análisis de la covarianza (ANCOVA) no se encontraron diferencias significativas ($F=1,5096$; $df=3, 59$; $p>0,05$) entre pendientes de las relaciones del consumo de oxígeno con el tamaño de las 4 familias objeto de estudio, por lo que se calculó el valor de la pendiente común ($bc = 1,124 (\pm 0,034)$). Sin embargo, el test de elevaciones sí mostró la existencia de diferencias significativas entre las familias. En concreto, el test indica la existencia de diferencias significativas entre las familias F2 (que presenta la elevación más baja) y F4 ($F2$ vs $F4$: $q=4,3689$; $df=3, 35$; $p<0,05$).

Como puede observarse en la Tabla 2, el consumo de oxígeno específico de masa de los individuos de la familia F2 es inferior al de los individuos de las otras familias, aunque dada la desviación estándar de los datos, la diferencia sólo es significativa con respecto a los de la F4. Este resultado sugiere que los individuos de la familia F2 presentan una mayor eficiencia metabólica.

Por otro lado, y como ya se ha mencionado anteriormente, al realizar el test de pendientes de las relaciones alométricas de tasa de aclaramiento, se encontraron diferencias significativas: el valor del exponente de masa de la cuarta familia era significativamente distinto al del resto de familias, $0,753 (\pm 0,057)$ frente a valores de ≈ 1 . Este dato indica que en F4 el incremento de tamaño provoca una reducción en la tasa de aclaramiento específica de masa, mientras que este parámetro permanece constante en el resto de familias; es decir, los individuos F y S de la familia F4, al contrario que las otras familias, sí que han mostrado diferencias en la tasa de filtración, presentando una CR superior las almejas S.

La Figura 3 muestra los valores medios de tasa metabólica (gasto de energía) y tasa de aclaramiento (ingreso de energía) específicos de peso en los individuos pequeños (SS) y grandes (M) de las 4 familias. Para la realización de esta figura se han seleccionado almejas suficientemente distintas entre ellas para poder observar sus diferencias; no obstante, no se han elegido los extremos totales, ya que en algunas familias había un solo ejemplar de L. En las familias F1, F2 y F3 se observa que las diferencias entre metabolismo y aclaramiento se mantienen más o menos constantes entre grandes y pequeñas. Sin embargo, en la F4 se observa que el incremento de tamaño provoca la reducción de la capacidad para filtrar. Por esta razón, en la familia F4 la capacidad de adquirir energía se va reduciendo con el incremento de tamaño y esto hace que el balance energético por unidad de masa disminuya, lo que podría entenderse como algo que limita la capacidad de los individuos para crecer. La existencia de esta diferencia significativa en la alometría de la tasa de aclaramiento en la cuarta familia podría explicar la alta abundancia de individuos de menor tamaño en esta familia, que fue la única en la que los individuos de longitud de concha inferior a 1mm (SSS) seguían activos.

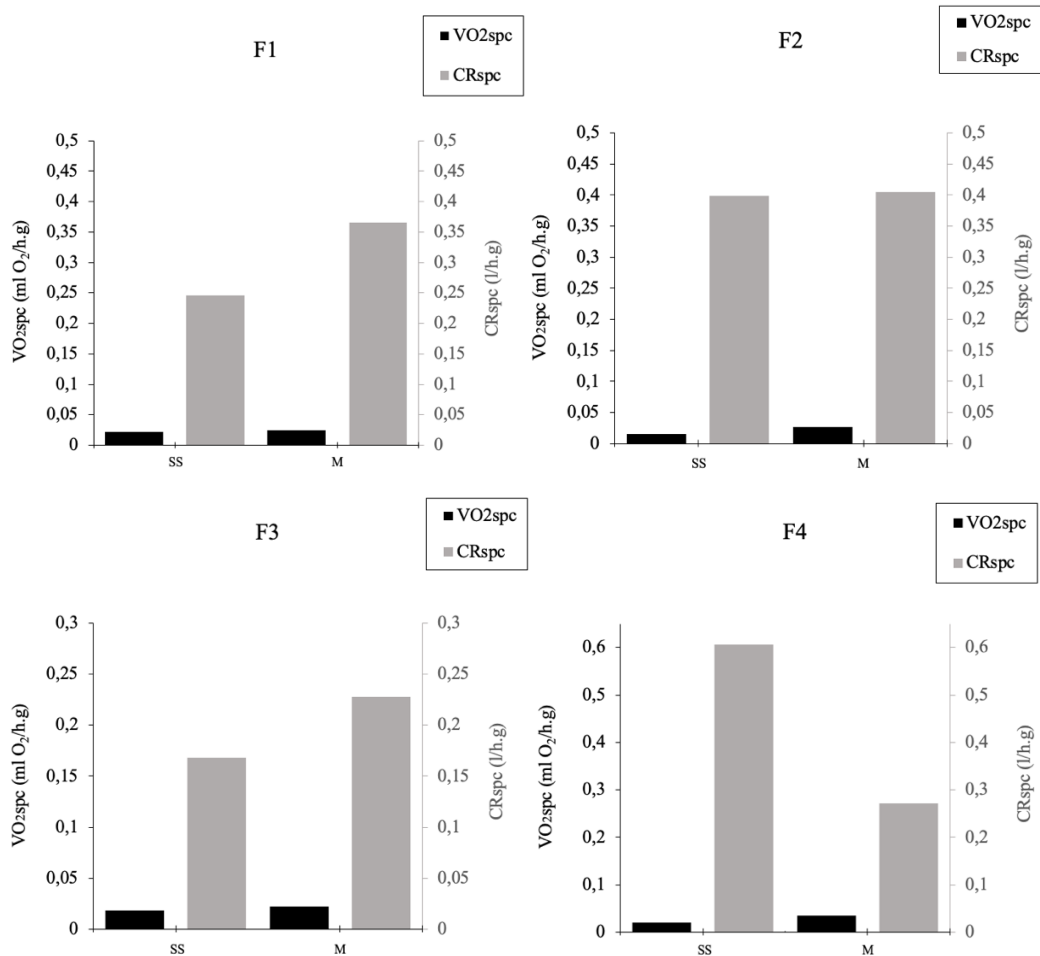


Figura 3. Exposición gráfica del consumo de oxígeno y tasa de aclaramiento específicos de masa para las tallas SS y M de cada familia.

5. CONCLUSIONES

Se han observado diferencias elevadas en tamaño entre individuos que han nacido el mismo día y pertenecen a la misma familia, lo que significa que estas almejas presentan diferencias en el crecimiento intra-familiares muy elevadas. Por lo tanto, puesto que las condiciones ambientales fueron idénticas, parece que el crecimiento depende, en gran medida, de posibles diferencias genéticas entre individuos.

Habiendo obtenido un valor aproximado de 1 para el exponente de masa tanto del consumo de oxígeno como de la tasa de aclaramiento, se puede afirmar que, en este caso, los resultados contradicen el principio básico de las relaciones alométricas, el cual sostiene que cuanto mayor es el tamaño del individuo menor es su tasa fisiológica específica (por unidad de masa). Esto indica que o bien las almejas pequeñas (S) presentan una actividad (metabólica y filtradora) menor de la que les correspondería por su tamaño o bien las grandes (F) presentan una actividad muy superior a la que les correspondería.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, en ambas variables el valor del exponente de masa es el mismo (excepto en la cuarta familia que en el consumo de oxígeno es 1 y en la tasa de aclaramiento

0,7), lo que significa que, incluso teniendo diferente longitud de concha, el balance energético por unidad de masa es igual; dicho de otra forma, la adquisición y el gasto energético es igual tanto en las grandes como en las pequeñas. El balance energético representa un porcentaje de crecimiento que es idéntico en las almejas de tamaño superior (F) y en las de menor tamaño (S). Esto significa que en términos relativos ambos tamaños están creciendo en la misma proporción y, por lo tanto, en términos absolutos están creciendo más las F (entendiendo por termino relativo el porcentaje y por termino absoluto la tasa total); es decir, ambas incrementan el peso de manera proporcional a su masa, y es por eso que las almejas F siempre crecerán más que las S. Todo esto parece indicar que las almejas S presentan una fuerte limitación en la capacidad de adquirir y utilizar energía.

Además, estudiando las diferencias inter-familiares, se observa que los individuos de la familia F2 necesitan un consumo de oxígeno inferior al que necesitan las demás familias, aun viviendo en las mismas condiciones. Gracias a este resultado, puede deducirse que los individuos de la segunda familia son metabólicamente más eficientes que los ejemplares de las demás, pero significativamente solo es más eficiente que la familia F4.

Asimismo, se observan diferencias en la abundancia de distintas tallas, en concreto, se ve que una familia es la más pequeña (la cuarta). Con los datos obtenidos, se podría deducir que la familia F4 es una de las familias con menos actividad metabólica (tiene significativamente una actividad inferior que la segunda familia), y que, además, el aumento de tamaño provoca una minoración en la tasa de aclaramiento específica de peso; es decir, cuando incrementa el tamaño disminuye el balance energético específico. Por esta razón, se puede concluir que en esta familia la tasa de crecimiento esta más limitada que en el resto, y esto podría interpretarse como la existencia de diferencias genéticas de esta familia con respecto a las demás.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bayne, B. L. (2000). Relations between variable rates of growth, metabolic costs and growth efficiencies in individual Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 251, 185–203.

Bayne, B. L. (2004). Comparisons of measurements of clearance rates in bivalve molluscs. *Marine Ecology Progress Series*, 276, 305-306.

Bayne, B. L., Newel, R.C. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. *Wilbur KM Saleuddin AS (eds) The Mollusca. Vol 4 Academic Press New York*, 407–515.

Bayne, B. L., Svensson, S., Nell, J. A. (1999a). The physiological basis for faster growth in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*. *The Biological Bulletin*, 197(3), 377-387.

Bayne, B. L., Hedgecock, D., McGoldrick, D., Rees, R. (1999b). Feeding behaviour and metabolic efficiency contribute to growth heterosis in Pacific oysters [*Crassostrea gigas* (Thunberg)]. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 233(1), 115-130.

Bernard, F.R. (1983). Physiology and the mariculture of some northeastern Pacific bivalve molluscs. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences Report No. 63*, (24 pp.).

Brown, J.R. 1988. Multivariate analyses of the role of environmental factors and sea-sonal and site-related growth variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Ecology Progress Series*, 45, 225–236.

Crisp, D.J. (1971). Energy flow measurements. *Holme, N.A., Mc Inture, A.D. (Eds.), Methods for the Study of Marine Benthos. Blackwell, Oxford*, 197–323.

Damuth, J. (2001). Scaling of growth: Plants and animals are not so different. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2113-2114.

Dickie, L. M., Boudreau, P. R., Freeman, K. R. (1984). Influences of stock and site on growth and mortality in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(1), 134-140.

Glazier, D. S. (2018). Rediscovering and reviving old observations and explanations of metabolic scaling in living systems. *Systems*, 6(1), 4.

Ibarrola, I., Arambalza, U., Navarro, J. M., Urrutia, M. B., Navarro, E. (2012). Allometric relationships in feeding and digestion in the Chilean mytilids *Mytilus chilensis* (Hupé), *Choromytilus chorus* (Molina) and *Aulacomya ater* (Molina): a comparative study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 426, 18-27.

Ibarrola, I., Larretxea, X., Navarro, E., Iglesias, J.I., Urrutia, M.B. (2008). Effects of body-size and season on digestive organ size and the energy balance of cockles fed with a constant diet of phytoplankton. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 178, 501–514.

Kleiber, M. (1932). Body size and metabolism. *ENE*, 1(9).

Mallet, A. L., Haley, L. E. (1983). Growth rate and survival in pure population matings and crosses of the oyster *Crassostrea virginica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(7), 948-954.

Pace, D.A., Marsh, A.G., Leong, P.K., Green, A.J., Hedgecock, D., Manahan, D.T. (2006) Physiological bases of genetically determined variations in growth of marine invertebrate larvae: a study of growth heterosis in the bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of experimental marine biology and ecology* 335, 188–209.

Tamayo, D., Ibarrola, I., Urrutia, M. B., Navarro, E. (2011). The physiological basis for inter- individual growth variability in the spat of clams (*Ruditapes philippinarum*). *Aquaculture*, 321(1), 113- 120.

Toro, J. E., Alcapan, A. C., Ojeda, J. A., & Vergara, A. M. (2004). Selection response for growth rate (Shell height and live weight) in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854). *Journal of Shellfish Research*, 23(3), 753-758.

Toro, J.E., Vergara, A.M., (1998). Growth and heterozygosity in a 12-month-old cohort of *Ostrea chilensis* obtained by mass spawning in the laboratory. *P.S.Z.N. Marine Ecology* 19, 311–323.

Toro, JE, Vergara, A.M., Gallegillos, R. (1996). Multiple-locus hetero-zygosity and growth at two different stages in the life cycle of the *Chilean oyster*, *Ostrea chilensis*. *Marine Ecology Progress Series* 134.151–158

Zar, J. H. (1996). Comparing Simple Linear Regression Equations. *Biostatistical analysis*, 3rd edition. (pp. 353-369). Upper saddle river, New Jersey: Prentice-Hall International.