Universidad Católica del Norte
Facultad de Ciencias del Mar
Departamento de Biología Marina

"Caracterización de la gametogénesis del erizo rojo Loxechinus albus (Molina, 1782) (Echinodermata; Echinoidea), alimentado con dietas artificiales"

María José Balanda Apey.

171
006

Profesor Guía: M. Sc. Chita Guisado Aránguiz.

2006

Universidad Católica del Norte
Facultad de Ciencias del Mar
Departamento de Biología Marina

"Caracterización de la gametogénesis del erizo rojo Loxechinus albus (Molina, 1782) (Echinodermata; Echinoidea), alimentado con dietas artificiales"

María José Balanda Apey.

Profesor Guía: M. Sc. Chita Guisado Aránguiz.

2006

Reg. 106355

M
B171
2006

UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA

"Caracterización de la gametogénesis del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinodermata: Echinoidea), alimentado con dietas artificiales"

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y RECURSOS NATURALES

María José Balanda Apey.
Profesor Guía: M. Sc. Chita Guisado Aránguiz.
2006

Caracterización de la gametogénesis del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinodermata: Echinoidea).

Por María José Balanda Apey.

Departamento de Biología Marina

Fecha: 20/03/2006

Aprobado Comisión de Calificación

Elisabeth von Brand Skopnik
Decano Facultad de Ciencias del Mar

UNIVERSIDAD CATOLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DECANO
CHILE

Chita Guisado Aránguiz
Profesor Guía

Exequiel González
Profesor Corrector

Enrique Dupré
Profesor Corrector

Tesis entregada como un requisito para obtener el título de Bióloga Marina en la Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. Sede Coquimbo.

2006

UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA

"Caracterización de la gametogénesis del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinodermata: Echinoidea), alimentado con dietas artificiales"

Actividad de Titulación presentada
para optar al Título de Bióloga Marina

MARIA JOSE BALANDA APEY

Coquimbo, marzo 2006

RESUMEN

En el presente estudio se realiza una caracterización de la gametogénesis del erizo rojo *Loxechinus albus*, alimentado con dietas artificiales, en la duodécima región, en la localidad de Punta Carrera. Se formularon seis dietas usando una base protéica vegetal y diferentes composiciones de aminoácidos y pigmentos, diseñadas con la finalidad de cambiar las características organolépticas de la gónada de *L. albus*, con estas se alimentó a los erizos por un período total de 30-90 días, para así comprobar el efecto de dichas dietas en la gametogénesis de *L. albus.*

Para la caracterización gametogénica se emplearon métodos cuantitativos y cualitativos, estos son: coeficiente gamético e índice de madurez gonadal, mediante el análisis microscópico de cortes histológicos de la gónada.

Las dietas utilizadas en este estudio no tienen efecto en la gametogénesis de *L. albus*, así como el coeficiente gamético e índice de madurez gonadal no presentan diferencias significativas en los períodos de octubre, noviembre y diciembre de 2002.

Dietas con aportes de proteínas animales son necesarias para originar cambios en el desarrollo gonádico de *L. albus*, por lo que los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo esperado.

ABSTRACT

In the present study a characterization of the gametogenesis of the red sea urchin *Loxechinus albus* from the Duodécima Región in the locality of Punta Carrera was conducted. Six diets, originally designed for improvement of gonad organoleptic conditions were prepared, based on a source of vegetable proteins and different compositions of amino acids and pigments. These diets were fed to the sea urchins for a period of 30 - 90 days in order to determine the effect of these different diets on gametogenetic processes. Two methods were used for the characterization of gametogenesis: the gametic coefficient (quantitative) and the maturation gonad index (qualitative), using microscopical analysis of histological section of the gonads. The different diets had no effect on the gametogenesis of *L. albus*. In the gametic coefficient and in the maturation gonad index, significant differences were not observed in the periods of october, november and december.

Diets with animal proteins as a source are necessary to cause changes in the gonadic development of *L. albus*.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta tesis, en especial a mi profesora guía Chita Guisado por su paciencia y apoyo constante. Además, a mis compañeros y amigos de laboratorio; Luly, Nico, Herman, Ester, Yasna y Melvin, los cuales me brindaron su apoyo incondicional en todo momento.

Dedico este trabajo a mi familia; Monse, Pauli, Rocío y en especial a mis padres Jorge y Laly, quienes me entregaron todo su cariño y palabras de aliento día a día para poder terminar mi tesis. Los quiero mucho. Gracias.

ÍNDICE

- Resumen I
- Abstract II
- Agradecimientos III
- Indice IV
- Indice de Tablas V
- Indice de Figuras VI
- Introducción 1
- Objetivos 5
- Materiales y Métodos 6
  1) Mantención de erizos 6
  2) Toma de muestras y traslado 7
  3) Tratamiento histológico 7
  4) Análisis microscópico cuantitativo 8
  5) Análisis microscópico cualitativo 10
  6) Análisis estadístico 13
- Resultados 14
  1) Análisis microscópico cuantitativo 14
  2) Análisis microscópico cualitativo 17
- Discusión 20
- Conclusión 26
- Bibliografía 27

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Composición proximal de las 6 dietas artificiales ingeridas por los erizos 34.

Tabla II: Promedio de ovocitos de las hembras en cada tratamiento, para octubre, noviembre y diciembre 35.

Tabla III: Valores de Índice de madurez gonadal (IMG) para machos y hembras en cada tratamiento, para octubre, noviembre y diciembre 35.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de frecuencias de tamaños de ovocitos (um) en los tratamientos, en octubre 36.

Figura 2: Distribución de frecuencias de tamaños de ovocitos (um) en los tratamientos, en noviembre 36.

Figura 3: Distribución de frecuencias de tamaños de ovocitos (um) en los tratamientos, en diciembre 36.

Figura 4: Coeficiente gamético (CG) para los machos, en octubre (a), noviembre (b) y diciembre (c) 37.

Figura 5: Coeficiente gamético (CG) para las hembras, en octubre (a), noviembre (b) y diciembre (c) 38.

Figura 6: Idice de madurez gonádico (IMG) para hembras y machos en los tratamientos, en octubre (a), noviembre (b) y diciembre (c) 39.

Figura 7: Corte histológico de hembra en estado 3 de desarrollo gonádico. OPV= ovocitos previtelogenicos (4x) 40.

Figura 8: Acino de hembra en estado 4 de desarrollo gonádico. OV= ovocitos vitelogénicos (4x) 40.

Figura 9: Acino de hembra en estado 5 de desarrollo gonádico. OM= ovocitos maduros (4x) 41.

Figura 10: Acino de hembra en estado 1 de desarrollo gonádico. FN= fagocitos nutritivos (10x) 41.

Figura 11: Macho en estado 3 de desarrollo gonádico. ES= espermatozoides, CE= columna espermatogénica (4x) 42.

Figura 12: Macho en estado de desarrollo gonádico 4. ES= espermatozoides 42.

Figura 13: Macho en estado 5 de desarrollo gonádico. ES= espermatozoides, CE= columna espermatogénica (4x) 43.

Figura 14: Corte histológico de macho en estado de desarrollo 1. Espermatozoides en proceso de reabsorción. FN= fagocitos nutritivos, ES= espermatozoides (4x) 43.

Figura 15: Macho en estado de desarrollo gonádico 2. CE= columna espermatogénica, FN= fagocitos nutritivos (4x) 44.

INTRODUCCIÓN

El erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782), es un equinoideo regular altamente explotado en Chile y de gran valor comercial (Cárcamo, 2003). *L. albus* se distribuye geográficamente desde Callao, Perú, hasta Tierra del Fuego, Chile, llegando hasta la Isla de Los Estados, Argentina, en su dispersión oriental (Yáñez & Castillo, 1973). Respecto a su distribución batimétrica, *L. albus* se distribuye desde la zona intermareal hasta 340m de profundidad (Larraín, 1975). Esta especie se caracteriza por su caparazón hemisférico de color verde, con tonalidades rojizas o moradas en ambulacros e interambulacros; es una especie gonocórica, que no presenta dimorfismo sexual y tiene actividad gametogénica a partir de los 40 a 45 milímetros de diámetro máximo. No obstante, a nivel poblacional se estima que el tamaño de primera madurez en las hembras es a los 45 milímetros, mientras que los machos la alcanzan a los 55 milímetros (Bay-Schmith *et al.,* 1981).

La gametogénesis comprende una serie de cambios abruptos en la actividad de la gónada, desde el almacenaje de nutrientes en células somáticas, al rápido incremento en el número y tamaño de las células germinativas (Pearse & Cameron, 1991). Los nutrientes utilizados en la producción de cada ovocito o espermatozoide son inicialmente almacenados en células somáticas, ubicadas dentro de la gónada, llamadas fagocitos nutritivos (NP) (Holland & Holland, 1969). El período reproductivo en *L. albus* normalmente se extiende desde julio a diciembre en la zona centro sur del país y desde noviembre a diciembre en la zona norte (Guisado & Castilla, 1987). El desove ocurre una vez al año por un período de 1 a 3 meses,

dependiendo de la ubicación geográfica, aconteciendo mas tarde en el año conforme se avanza hacia el sur. No obstante, las poblaciones de *L. albus* de Punta Arenas no siguen la tendencia en el desfase latitudinal en la época de desove descrito para el resto de la costa, debido a que tales poblaciones de erizo rojo se encuentran sometidas a un régimen oceanográfico distinto al que caracteriza la costa desde los 40°S – 42°S al norte, influida por la corriente de Humboldt (Zamora & Stotz, 1992). En erizos de la zona sur, el ciclo reproductivo puede describirse en cuatro etapas: maduración, desove, reabsorción y descanso. El crecimiento y proliferación de las células empieza entre agosto y septiembre, alcanzando su máximo en noviembre, cuando tiene lugar el desove prolongándose hasta diciembre, los gametos que no fueron desovados son reabsorbidos en la gónada, iniciándose una etapa de descanso, para luego comenzar nuevamente la gametogénesis (Bustos & Olave, 2001).

Las gónadas de *L. albus* presentan diferencias organolépticas dependiendo de la ubicación geográfica, además de otros factores, bióticos y abióticos. Debido a estas diferencias es común encontrar en un mismo hábitat erizos con gónadas de distinta coloración, desde una coloración amarilla (la habitual), hasta gónadas con tonalidades más oscuras cercanas a la coloración marrón, que presentan además un sabor considerablemente más amargo, lo que afecta su valor en el mercado, principalmente japonés (Gutiérrez, 2003). Se estima que un 30 a 40% de la pesquería del erizo rojo en la zona sur de Chile se ve afectada por este fenómeno, bajando considerablemente su valor comercial (Bustos et al., 2003).

Recientemente se han elaborado dietas que satisfacen las necesidades energéticas de los erizos de mar, promueven el crecimiento y mejoran la calidad de la gónada

(Pantazis et al., 2000; Pearce et al., 2002). Estos estudios han evaluado por separado diversas características del alimento (proteínas, lípidos, minerales) en términos de los efectos generados en crecimiento, producción de gónada y formación de exoesqueleto (González-Durán, 2005; Sepúlveda, 2001).

Se han realizado variados estudios sobre el efecto de dietas preparadas, en el crecimiento gonádico de los erizos de importancia económica en otros países. Experimentos realizados por De Jong-Westman *et al.* (1995), en *Strongylocentrus droebachiensis* reportan una supervivencia mayor al 95% y un incremento en los índices gonádicos usando dietas preparadas con altos contenidos de proteínas. Fernández (1996) al trabajar con *Paracentrotus lividus,* demostró que el índice gonádico de los erizos alimentados con dietas preparadas es mayor que en erizos de bancos naturales. Lawrence *et al.* (1997) y Olave *et al.* (2001), han demostrado la factibilidad de alimentar a poblaciones de *L. albus* con alimentos preparados. Cárcamo (2003) comprobó que erizos rojos alimentados con dietas preparadas a base de algas aumentaron sus índices gonádicos. Por su parte Olivarez (2003) observó que la gametogénesis de *L. albus* alimentado con dietas preparadas, es mas rápida que aquellos de medio ambiente natural. Durante sus experimentos, más de un 50% de las hembras desovaron y un porcentaje aún más alto de machos alcanzaron su madurez. Vidal (2003) al usar dietas preparadas con diferentes tipos y concentraciones de carotenoides, observó que *L. albus* mejoró la calidad de su gónada. Sepúlveda (2001) constató que la alimentación con dietas preparadas presenta ventajas comparativas respecto a la alimentación natural, ya que se regula la asignación del recurso alimenticio, optimizando el crecimiento de *L. albus*.

En el proyecto FONDEF DOOI 1149 "Desarrollo de dieta artificial para optimizar la calidad comercial de gónadas café del erizo rojo *Loxechinus albus*, de la XII Región, destinados al mercado de exportación", se formularon y manufacturaron 6 diferentes dietas, las que variaron en el tipo y contenido de pigmentos carotenoides, así como en la composición porcentual de aminoácidos, además de otros compuestos en menor medida (Tabla I). Estas fueron formuladas específicamente para alimentar a erizos rojos que presentaban gónadas deficientes tanto en su sabor como en su coloración, y de esta manera mejorar las condiciones organolépticas de la gónada. Es por lo tanto, el interés de este estudio efectuar una caracterización de la gametogénesis de individuos maduros de *L. albus* alimentados con 6 diferentes dietas, utilizadas en el proyecto FONDEF DOOI 1149.

Considerando que las dietas utilizadas en la alimentación de *L. albus,* se basan en diferencias a nivel de pigmentos y aminoácidos, no se espera encontrar cambios en la actividad gametogénica en los individuos de este estudio.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la gametogénesis del erizo rojo *Loxechinus albus*, alimentado con diferentes dietas artificiales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Determinar el índice de madurez gonadal para machos y hembras de *Loxechinus albus,* alimentado con dietas preparadas.

2.- Determinar el coeficiente gamético para machos y hembras de *Loxechinus albus*, alimentado con dietas preparadas.

METODOLOGIA

1) MANTENCION DE LOS ERIZOS

Fueron recolectados 3300 erizos entre junio y julio de 2002, provenientes de bancos de la Duodécima Región de Chile. Se mantuvieron en un sistema conformado de 63 jaulas de cultivo de 90 x 90 x 30 centímetros, confeccionadas en una estructura metálica y forradas en malla de abertura de 0.5 cm., mantenidas mediante un sistema long-line anclado al fondo a 2 metros de profundidad, en el sector Punta Carrera, ubicado en el Estrecho de Magallanes a 50 kilómetros de la ciudad de Punta Arenas. Se constituyeron 7 tratamientos, cada uno formado por 9 jaulas, con 50 individuos de 8 a 10 centímetros de longitud en cada una de las jaulas. En los primeros 6 tratamientos se evaluó la eficiencia de 6 diferentes dietas preparadas conformadas principalmente por concentraciones iguales de proteínas, lípidos, carbohidratos, suplementos vitamínicos, suplementos minerales y diferente composición de aminoácidos y pigmentos (Tabla I). Estas dietas artificiales, constituidas por pellets esféricos de 1,5 centímetros, fueron desarrolladas en etapas previas al proyecto en el "Centro de estudios en ciencia y tecnología de los animales" (CECTA), perteneciente a la Universidad de Santiago. El último tratamiento consistió en una dieta control a base de alga fresca, en su mayoría trozos de *Macrocystis* spp.. El alimento fue administrado cada cinco días de manera manual y en una dosis de 0.6 gramos/erizo/día. La temperatura del agua durante el experimento se aproximó a los 8°C.

2) TOMA DE MUESTRAS Y TRASLADO

Cumplidos los 30 días de alimentación se realizó el primer muestreo el 4 de octubre, el segundo muestreo el 10 de noviembre a los 60 días con alimentación artificial y el tercer y último muestreo el día 12 de diciembre de 2002 a los 90 días con alimentación artificial. Se muestrearon un total de 420 erizos por mes, realizando 3 réplicas de 20 ejemplares cada una, por tratamiento.

Para el análisis histológico, se les extrajo a cada ejemplar un trozo de la gónada ubicada en el ínterambulacro 2 del individuo. Los cortes histológicos transversales de la gónada fueron enviados desde la XII Región del país hacia la Universidad Católica del Norte, en casetes histológicos mantenidos en recipientes plásticos y preservados con alcohol de 70 grados.

3) TRATAMIENTO HISTOLÓGICO

Las muestras se fijaron por 24 horas en solución Davidson ´s (Shaw & Battle, 1957). Posteriormente se realizó la técnica histológica corriente (Martoja & Martoja-Pierson, 1973). Se realizaron cortes gonadales de 7 micrómetros de espesor con un micrótomo de rotación de Leitz (modelo 1512), y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina acuosa amarillenta alcohólica. Los cortes histológicos fueron realizados en un microscopio de luz Zeiss y posteriormente fotografiados con una cámara Pixera (modelo PVC 100C).

4) ANÁLISIS MICROSCÓPICO CUANTITATIVO DE LAS PREPARACIONES HISTOLÓGICAS:

A) Hembras:

La metodología usada, fue la propuesta por Pearse (1969). Para esto, se midió el diámetro de todos los ovocitos presentes en acinos gonadales circulares que aparecían en un tansecto que fue desplazado por toda la preparación, hasta completar 50 ovocitos medidos. Finalmente, se calculó un diámetro promedio de ovocitos para cada tratamiento.

A1) Estimación del coeficiente gamético ovocitario: Este coeficiente fue determinado para todas aquellas hembras que presentaron ovocitos vitelogénicos contenidos en la sección del acino, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CG = \frac{\text{N° de ovocitos maduros en la sección del acino}}{\text{Diámetro del acino}} \times 1000$$

A2) Índice de madurez gonadal: Para el cálculo de este índice se utilizó la clasificación de estados gonadales, que se dan a conocer en el ítem 5 A). La fórmula a utilizar fue la propuesta por Yoshida (1952):

$$IMG = \frac{\sum(n * F)}{N}$$

Donde: F = estado de desarrollo gametogénico, con valores entre 1 (estado desovado) a 5 (estado maduro)

n = número de animales en estado F

N = número de animales de la muestra

B) Machos

B1) Estimación de la variación del área ocupada por la columna espermatogénica y la capa de espermatozoides:

Para la estimación de estas áreas se utilizó la metodología propuesta por Holland y Holland (1969), para lo cual se midió el grosor del tejido espermatogénico y el diámetro de la masa de espermatozoides en el lumen de 10 acinos circulares de cada muestra histológica.

B2) Estimación del coeficiente gamético testicular:

El cálculo de este coeficiente se realizó midiendo los diámetros máximos y mínimos de la sección del acino y de la masa de espermatozoides que se encontraron en el lumen de éste.

5) ANALISIS MICROSCOPICO CUALITATIVO DE LAS PREPARACIONES HISTOLOGICAS

A) Escala microscópica de madurez sexual:

En este análisis se determinaron los cambios en el desarrollo gametogénico de los acinos de los machos y hembras microscópicamente, y fueron clasificados en los estados de desarrollo, según su madurez gonadal, de acuerdo a la metodología descrita por Fuji (1960) y Zamora & Stotz (1992), tanto para hembras como para machos. Los estados usados se muestran a continuación:

Hembras: Estados ováricos

Estado I (Desovado o Post evacuado):

- Fagocitos nutritivos abundantes en el lumen del acino
- Ovocitos maduros en reabsorción
- Grupos de ovogonias y ovocitos previtelogénicos en la pared interna del acino

Estado II (Recuperación):

- Presencia de ovocitos previtelogénicos (cito I) en la periferia del acino
- Algunos fagocitos nutritivos

Estado III (Crecimiento o madurez progresiva inicial):

- Presencia de ovocito previtelogénicos y fagocitos nutritivos
- Capa basal del acino cubierto con ovocitos vitelogénicos

Estado IV (Prematuro o madurez progresiva media):

- Pocos ovocitos previtelogénicos
- Numerosos ovocitos vitelogénicos en la pared del acino algunos adheridos y otros pedunculados

Estado V (Maduro):

- Ovocitos maduros se encuentran en todo el lumen del acino, tomando una forma poligonal
- Tejido germinal y fagocitos nutritivos restringidos a la periferia del acino

Machos: Estados testiculares

Estado I (Vacío o Post evacuado):

- Lumen del acino ocupado totalmente por fagocitos nutritivos
- Escasos espermatozoides en el lumen en proceso de reabsorción

Estado II (Recuperación):

- Columna de tejido espermatogénico delgada conteniendo espermatogonias y espermatocitos
- Lumen aún con algunos fagocitos nutritivos

Estado III (Crecimiento o madurez progresiva inicial):

- Grosor de la columna espermatogénica aumentando
- Presencia de algunas espermátidas en proceso de desprendimiento hacia el centro del acino
- Algunos fagocitos nutritivos en el lumen del acino

Estado IV (Prematuro o madurez progresiva media):

- Se observa columna espermatogénica completa
- Espermatozoides en el lumen del acino
- Espermátidas en proceso de desprendimiento

Estado V (Maduro):

- Lumen del acino ocupado totalmente por espermatozoides
- Tejido espermatogénico y fagocitos nutritivos reducidos a una banda periférica

6) ANALISIS ESTADISTICO

Con el fin de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los 7 tratamientos para los 3 muestreos realizados a *L albus*, se realizará un análisis de varianza en bloque de Durbin-Watson. Previo al análisis se determinará homocedasticidad (Test de Levene) de varianza y la normalidad de los datos (Test de Lillierfors).

RESULTADOS

1) Análisis Microscópico Cuantitativo de las Preparaciones Histológicas

A) Variación de diámetro de los ovocitos

A.1) Primer muestreo período octubre

Al analizar los cortes histológicos del primer muestreo (octubre de 2002), es posible constatar que el diámetro promedio de ovocitos presentes en los acinos de las hembras, para todos los tratamientos, varió entre 85,43±13,28µm y 92,66±11,49µm (Figura 1). Se observaron pocos ovocitos previtelogénicos, encontrando además ovocitos vitelogénicos en la pared del acino y algunos pedunculados. El promedio de los diámetros de ovocito en los tratamientos fue de 85,43±13,28 micrómetros (Tabla II). El promedio de diámetros de los ovocitos en los diferentes tratamientos varió entre 85,43±13,28 micrómetros en el tratamiento 1, 92,66± micrómetros en el tratamiento 6 y 92,11± micrómetros en el tratamiento 7, como se muestra en la Tabla II. No existiendo diferencias significativas entre ellos ($p<0,607$) ($F=0,771$).

A.2) Segundo muestreo período noviembre

Los ovocitos de las hembras del segundo muestreo, se mantuvieron dentro del rango de tamaño observado en el muestreo anterior. Sin embrago los erizos de los tratamientos; 1, 2, 3 y 4 (Figura 2) presentaron un diámetro de ovocito mayor (91,11±12,30 µm, 93,8±11,21 µm, 91,86±13,03 µm y 90,1±13,77 µm respectivamente) con respecto a aquellos de los tratamientos 5,6 y 7 (Tabla II), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p<0,199$) ($F=0,722$) En general se puede observar que se mantiene el estado de maduración de los erizos con respecto a los muestreos previos, no observándose desove de los animales.

A.3) Tercer muestreo período diciembre

Transcurridos 90 días de experimentación es posible apreciar que la gran mayoría de los ovocitos de los acinos de las hembras del tercer muestreo, se encontraban dentro del rango observado en los meses anteriores (Figura 3). Sin embargo el diámetro promedio de los ovocitos de todos los tratamientos presentó un aumento, variando entre 87,81±19,23 µm y 96,6±9,41 µm, excepto en el tratamiento 2 (Tabla II), en donde experimentó una disminución del diámetro promedio de los ovocitos, de 93,8µm en noviembre a 87,8µm en diciembre. El promedio mayor en el diámetro de los ovocitos se presentó en el Tratamiento 4 (Figura 3c). Las variaciones observadas en los diámetros de ovocito en el tercer muestreo no fueron sin embrago estadísticamente significativas ($p<0,151$) ($F=1,963$).

B) Variación del área ocupada por la columna espermatogénica y la capa de espermatozoides

Al utilizar la metodología propuesta por Holland y Holland (1969), se obtiene que el porcentaje de área del acino ocupada por espermatozoides, en las muestras histológicas analizadas de los 7 tratamientos en los 3 muestreos realizados, no presentaron diferencias significativas ($p<0,472$) ($F=0,993$). No obstante, en el tratamiento control (tratamiento 7) de noviembre (Figura 4b), erizos alimentados con *Macrocystis* spp., presentaron un porcentaje mayor de área ocupada por columna espermática, si se le compara con el muestreos 1 y 3, realizados en octubre y diciembre respectivamente (Figuras 4a y 4c). Estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p<0,161$) ($F=1,906$).

C) Estimación del coeficiente gamético

C.1) Hembras

A pesar de evidenciar diferencias en el valor del coeficiente gamético ovocitario entre los diferentes tratamientos de los tres muestreos realizados, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p<0.151$) ($F=1.963$). El valor más bajo de coeficiente gamético se presentó en diciembre en el tratamiento 4 (Figura 5c).

C.2) Machos

El área ocupada por la masa de espermatozoides ubicada en el lumen, aumentó en diámetro durante noviembre como muestran los porcentajes de coeficiente gamético, de los machos del muestreo 2 (Figura 4b). Coincidiendo además con el pico del área ocupada por columna esperamatogénica para el tratamiento control 7 del muestreo 2, como se mencionó en el párrafo B).

2) Análisis microscópico cualitativo de las preparaciones histológicas

A) Escala microscópica de madurez sexual

A.1) Hembras

Entre octubre y noviembre, se observó que el índice de madurez gonadal ovárico (IMG) de las hembras no varió mayormente (Figura 6a y 6b respectivamente) y en ambos casos fue mas frecuente hallar acinos que se encontraban en el estado 3, 4 y algunos acinos en el estado 5 de desarrollo gonádico. Describiéndose en el estado 3 acinos con presencia de ovocitos previtelógenicos y fagocitos nutritivos y la capa basal del acino cubierto con ovocitos vitelogénicos (Figura 7). Para el caso del estado 4 los acinos se observan acorde con lo planteado en la metodología y es posible observar ovocitos adheridos a la capa basal del acino y algunos ovocitos pedunculados, características que se observan en la Figura 8. En el caso de los acinos del estado 5, se observaron ovocitos maduros más cercanos al lumen del acino, adquiriendo en algunos casos formas poligonales (Figura 9). En relación a los valores

arrojados por el IMG, se observa en la tabla III, que este índice presentó un aumento de octubre a noviembre para posteriormente en diciembre disminuir, siendo este hecho más evidente en las hembras alimentadas con los tratamientos 5, 6 y con el alga *Macrocystis* spp. (tratamiento control), en donde para el tratamiento 5 se obtiene en octubre un valor de 3,233 de IMG, aumentando luego a 3,491 en noviembre, para luego disminuir a 2,527 en diciembre (Tabla III). Es precisamente en diciembre en el que fue posible contabilizar mayor cantidad de acinos pertenecientes al estado 1 y en menor medida a los estados 4 y 5. En el caso de los ovocitos del estado 1 se observaron acinos con mayor cantidad de fagocitos nutritivos y la presencia de ovocitos maduros siendo reabsorbidos, los que además se ubican en el lumen del acino (Figura 10). No obstante de esta disminución, en el tratamiento de dieta 1 de diciembre, se observó el IMG más elevado de todos los meses de experimentación alcanzando un valor de 3,905 (Tabla III). Sin embrago este hecho y las diferencias entre los muestreos de octubre, noviembre y diciembre, no fueron estadísticamente significativas ($p<0,614$) ($F=0,507$).

A.2) Machos

Desde octubre hacia diciembre fue posible apreciar en los machos de *L albus*, que los valores del índice de madurez gonadal testicular (IMG) se presentaron de forma similar que en las hembras, ya que se observó un aumento en noviembre para luego disminuir en diciembre, siendo esto evidenciado en los tratamientos 2, 3, 5 y en el tratamiento control. Es precisamente en los machos alimentados con *Macrocystis*

spp., en donde se obtuvo el valor mas elevado de IMG (3,515) en todos los meses de experimentación (Tabla III).

Al observar los cortes histológicos de los machos del muestreo realizado en noviembre, es posible constatar una mayor frecuencia de acinos pertenecientes a los estados 3, 4 y algunos acinos en el estado 5 de desarrollo gonádico. Para los acinos correspondientes al estado 3 del desarrollo gonadal, se observó la presencia de algunas espermátidas en proceso de desprendimiento hacia el centro del acino, además de algunos fagocitos nutritivos en el lumen del acino, también es posible apreciar que el grosor del tejido espermatogénico va en aumento (Figura 11). En los acinos del estado 4 ya es posible observar que el tejido espermatogénico se ha engrosado en comparación al estado 3 formando una columna espermatogénica además se observa la presencia de espermatozoides en el lumen del acino y algunas espermáticas en proceso de desprendimiento (Figura 12). Los acinos pertenecientes al estado 5, presentan tejido espermatogénico y fagocitos nutritivos reducidos solo a una banda periférica y casi la totalidad del lumen esta ocupado por espermatozoides (Figura 13).

Como ya se planteó, en diciembre se observó una baja en el IMG (Tabla III), por lo que en los cortes histológicos existe una mayor frecuencia de acinos en estado 1 y 2, y en menor medida acinos en estado 3 y 4 de desarrollo gonadal. El estado 1 está ocupado totalmente por fagocitos nutritivos formando una trama eosinófila, confiriéndole al acino un aspecto vacuolado (Figura 14). Por su parte los acinos en estado 2 se encuentran en proceso de recuperación (Figura 15). No se reportan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,221$) ($F=1,718$).

DISCUSION

En la primea etapa de experimentación correspondiente a octubre, se observó que en tres de los siete tratamientos las hembras presentaron promedios de diámetros mayores en sus ovocitos. Los tratamientos que presentaron estas diferencias de diámetro fueron la dieta control constituida por *Macrocystis* spp. y la dieta 6, aunque estas no son estadísticamente significativas la composición de la dieta 6 difiere sólo en la constitución proximal de algunos de sus aminoácidos, principalmente ácido glutámico, sin variar ningún otro componente. Es por esta razón que se esperaba que, no se presentasen diferencias significativas, ya que el cambio en la concentración de los aminoácidos sería destinado a generar un cambio en el sabor de la gónada y no tiene relevancia en la gametogénesis, ya que Agatsuma (2000) identificó entre los componentes más importantes y determinantes del sabor de la gónada, los aminoácidos libres alanina y ácido glutámico para el sabor dulce, arginina y valina del sabor amargo y a la metionina como responsable del sabor intrínsico de la gónada de erizo.

En noviembre y diciembre se observó que el diámetro promedio de ovocitos en los 7 tratamientos se mantuvo dentro de un rango similar a octubre, sin existir diferencias significativas entre ellos, a pesar de que en estos meses y especialmente en diciembre se observaron diámetros de ovocito mayores, es posible que esto se deba a que en la duodécima región, es en estos meses cuando *L. albus* alcanza su máximo de maduración gonadal (Bustos & Olave, 2001). No obstante, en diciembre se observó una caída en el promedio de diámetro de ovocito en el tratamiento 2, lo que podría

atribuirse a un posible desove de los animales alimentados con esta dieta. En el caso de los machos no se observaron diferencias significativas, al tomar en cuenta el área ocupada por la columna espermatogénica y la capa de espermatozoides. Aunque en noviembre, específicamente en el tratamiento control, erizos alimentados con *Macrocystis* spp., presentaron un porcentaje mayor de área ocupada por la columna espermática. Este hecho y las diferencias observadas en las hembras mencionadas anteriormente, pueden deberse a que comúnmente dentro de una población, no todos los individuos se comportan de una misma manera y que pueden presentar diferencias en los diámetros de los ovocitos en el caso de las hembras o en el área ocupada por espermatozoides en el caso de machos, sin que esto signifique que haya disminuido o aumentado el crecimiento gonádico (Olivarez, 2003). Es también necesario enfatizar la variabilidad intra-gonadal observada durante el estudio en la maduración de *L.* albus, ya que es posible encontrar en la misma gónada tanto para machos y hembras, algunos acinos mas desarrollados que otros. Estas diferencias han sido descritas para otras especies de echinoideos por otros autores (Fuji, 1960; Pearse, 1969).

Un método comúnmente usado para la estimación de el crecimiento gonadal, es el índice gonádico (IG), que si bien ha sido usado por otros autores para la estimación reproductiva de erizos, no siempre es recomendable en animales con cavidades llenas de fluido, ya que la proporción de la masa del cuerpo disminuye cuando aumenta el tamaño del individuo, pudiendo significar un error en el cálculo del índice (Giese & Pearse, 1974). Además, es necesario señalar que las gónadas de los echinoideos funcionan también como órganos de almacenamiento de nutrientes, de modo que no todo ascenso en el valor del IG corresponde necesariamente un incremento de la

actividad gametogénica, sino que también puede obedecer a una acumulación de material de reserva (Zamora & Stotz, 1992). Es por lo tanto que en esta experimentación se llevan a cabo otros métodos de indicación de crecimiento gonádico, como son el coeficiente gamético (método cuantitativo) e índice de madurez gonadal (método cualitativo).

En cuanto al método cuantitativo utilizado, es decir el coeficiente gamético, en las hembras de *L. albus* si bien se evidenciaron diferencias, estas no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las 7 dietas en los meses de experimentación. En general se pudo observar una caída de esta variable desde el primer mes hasta el último, lo que podría significar que la cantidad de ovocitos maduros en el centro del acino disminuyó en el tiempo, debiéndose quizás a la existencia de desoves parciales o totales, hecho que se ve reflejado no solo en este coeficiente, sino que en los otros métodos utilizados. Por su parte los machos tampoco presentaron grandes diferencias en el coeficiente gamético en los tres meses de muestreo. A excepción de un aumento presentado por los machos en el mes de noviembre, específicamente los alimentados con la dieta control a base de algas y que puede tener relación, como ya se dijo anteriormente con la época del muestreo, la que coincide con el máximo de desarrollo gonádico descrito para la especie en la zona sur del país.

Al examinar los resultados obtenidos por el análisis microscópico cualitativo, es decir los valores del índice de madurez gonadal tanto en hembras como en machos de *L. albus,* no se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque si fue posible observar en el caso de las hembras de octubre y noviembre, acinos en estado

de madurez progresiva tanto inicial como madurez progresiva media y en menor medida acinos en estado maduro, para posteriormente en diciembre encontrar acinos en estado en crecimiento o madurez progresiva inicial y encontrándose algunos en estado 1, es decir acinos en estado desovado o post-evacuado, concordando con la época de estudio como se ha manifestado anteriormente. Un escenario similar presentó el índice de madurez gonadal en machos. En los 2 primeros meses, octubre y noviembre, fueron estados más avanzados los que fueron detectados en el análisis microscópico de los acinos, correspondientes por lo tanto a acinos en estados de crecimiento, pre-maduro y maduro. Posteriormente en diciembre se observaron acinos post-evacuados, es decir sin una gran presencia de espermatozoides en el lumen, pero si mayor cantidad de fagocitos nutritivos, los pocos espermatozoides observados estaban siendo reabsorbidos por los fagocitos. Diversos autores mencionan la relación entre las células presentes dentro de los folículos de los echinoideos y su estado de desarrollo gonadal. Holland & Holland (1969) nombra tres tipos de células; fagocitos nutritivos, células gametogénicas y gametos. En el caso específico de este estudio, fue posible observar dicha relación entre la presencia/ausencia de los fagocitos nutritivos y el estado, tanto para machos como hembras, ya que al comienzo del desarrollo germinativo de la gónada, el número de fagocitos fue mayor, disminuyendo luego para casi desaparecer en los estadíos mas avanzados de desarrollo gonadal. Olivarez (2003) al trabajar con *L. albus* reconoce por lo menos tres estados relacionados con los fagocitos nutritivos. El primer estado dominado por un 70%, el segundo por un 60% y el tercero por menos de un 10% de fagocitos, corresponden a los estados 1, 2 y 3 respectivamente. Los autores Nicotra y

Serafino (1988) por su parte también identifican tres estadíos llamándolos; estado de reposo ("NP resting stage"), estado de crecimiento o proliferación ("NP growing stage") y un último estado de reducción o escasez ("NP depleting stage"). Durante el presente estudio todos los individuos de cada unos de los tres muestreos, presentaron la misma relación inversa entre la cantidad de fagocitos nutritivos y el estado de madurez. No obstante esta relación no fue estimada de una manera cuantitativa, como en el caso de los autores antes mencionados, sino que sólo de una manera cualitativa gracias a la observación de los cortes histológicos. Por otra parte este hecho podría indicar que aunque quizás en el caso específico de esta tesis las dietas utilizadas no fueron las más indicadas, la alimentación no tendría un efecto preponderante en la proporción de fagocitos nutritivos en el desarrollo gametogénico. Esto concuerda además con lo descrito por Olivarez (2003), que al alimentar a *L. albus*, con distintas dietas artificiales observó que no se vieron afectados los porcentajes de fagocitos nutritivos descritos anteriormente por el.

Las dietas experimentales usadas en el presente estudio al estar formuladas como ya se explicó, dirigidas a originar un cambio en las características organolépticas de la gónada usaron como fuente proteica una base de origen vegetal. Desde el punto de vista del crecimiento gonádico y a raíz de estudios realizados en erizos de mar (Akiyama et al., 1997; Fernández & Caltagirone, 1994; De Jong-Westman et al., 1995; Lawrence et al., 1992), se puede afirmar que la importancia de las proteínas durante las etapas tempranas de desarrollo somático es alto (20%), motivo por el cual existe una relación directa entre el contenido proteínico de la dieta y el desarrollo somático del exoesqueleto, además las proteínas de origen animal, como por ejemplo

harina de pescado, presentan en general mayor eficiencia y promueven factores de conversión superiores que las de origen vegetal. Cook et al. (1998) comprobó que tanto el crecimiento somático como gonádico de la especie *Psammechinus miliaris*, fue mayor al ser alimentado con una dieta a base de salmón que cuando se alimentó con una a base de algas. En el caso de los lípidos, los cuales tampoco variaron en contenido en las dietas utilizadas, para la mayoría de los equinodermos éstos no solo cumplen la función de ser importantes constituyentes estructurales, sino que también de reserva, almacenándose principalmente en los tejidos gonádicos de individuos maduros. Por el contrario, en individuos inmaduros o desovados se almacenan en otros tejidos. (Giese & Pearse, 1974)

Es por estas razones que en el estudio efectuado no se esperaban diferencias en la gametogénesis de los individuos experimentales, ya que como se explicó anteriormente los cambios en la composición porcentual de las dietas, variaron en la cantidad de aminoácidos y pigmentos, pero la fuente de proteínas y lípidos, componentes importantes en el crecimiento gonádico, fue siempre la misma en todas las dietas utilizadas.

CONCLUSIONES

1.- La gametogénesis de machos y hembras del erizo rojo *Loxechinus albus* no es afectada por las dietas utilizadas en este estudio.

2.- El coeficiente gamético en machos y hembras de *L. albus* no presentó diferencias significativas para ninguno de las 6 dietas utilizadas, en los meses de muestreo.

3.- El índice de madurez gonadal de individuos machos y hembras de *L. albus*, no presenta diferencias significativas en los períodos de octubre, noviembre y diciembre.

BIBLIOGRAFIA

Agatsuma, Y. 2000. Food consumption and growth of the juvenile sea urchin *Strongilocentrotus intermedius.* Fisheries Science, 66: 467-472.

Bay-Schmith, E., Werlinger, C. & J. Silva. 1981. Ciclo reproductivo annual del recurso erizo *Loxechinus. Albus* entre la X y XII regiones. Informe final proyecto de investigación convenio Subsecretaria de Pesca. Universidad de Concepción. 68pp.

Bustos, R. & S. Olave. 2001. Manual: Sea Urchin Culture (*Loxechinus albus*). Aquaculture Division. Instituto de Fomento Pesquero, Chile. 23pp.

Bustos, R., Guzmán, O. & C. Guisado. 2003. Color improvement of brown gonads of the sea urchin *Loxechinus albus* by artificial feed (abstract). Page 240. in Lawrence, J., editor. Sea Urchins. Fisheries and Ecology. Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture. Puerto Varas, Chile, 25-27 March 2003. DEStech Publications, Inc, Lancaster, Pennsylvania, USA.

Cárcamo, P. 2003. Effect of diet on gonadal and somatic producction of the sea urchin *Loxechinus albus* under sea-based cultivation conditions. Page 222-229 in Lawrence, J., editor. Sea Urchins. Fisheries and Ecology. Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture. Puerto Varas, Chile, 25-27 March 2003. DEStech Publications, Inc, Lancaster, Pennsylvania, USA.

Cook, E.J., Kelly, M.S. & J.D. Mckenzie. 1998. Somatic and gonadal growth of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin) fed artificial salmon feed compared with a macoalgal diet. Journal of Shellfish Research, 17: 1549-1555.

De Jong-Westman, M., March, B.E. & T.H. Carefoot. 1995. The effect of different nutrient formulation in artificial diets on gonad growth in the sa urchin *Strongylocentrus droebachiensis*. Canadian Journal of Zoology, 73: 1495-1502.

Fernandez, C. 1996. Croissance et nutrition de *Paracentrotus lividus* dans le cadre d'un Project aquacole avec alimentation artificielle. Tesis presentada para obtener el grado de Doctor con especialidad en Ecología Marina de la Universidad de Corse. Facultad de Ciencias y Tecnología. Francia.

Fernandez, C. & A. Calatagirone. 1994. Growth rate of adult sea urchins, *Pàracentrotus lividus* in a lagoon environment: the effect of different diet types. Page 655-660 in B. David, A. Guille, J. P. Féral & M. Roux, editor. Echinoderms through time. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.

Fuji, A. 1960. Studies on the biology of the sea urchin. II. Size at first maturity of two sea urchins, *Strongylocentrus mudus* and *S. intermedius.* Bulletin of the Faculty Fisheries Hokkaido University, 11: 43-48.

Giese, A. & J. Pearse. 1974. Reproduction of marine invertebrates. Academic Press New York and London.

González-Durán, E. 2005. Biología y metabolismo de erizos de mar. JAINA Boletín Informativo. Universidad Autónoma de Campeche, Mexico, 15: 1-6

Guisado, Ch. & J.C. Castilla. 1987. Historia de vida, reproducción y avances en el cultivo del erizo comestible chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinoidea: Echinidae). In: "Manejo y Desarrollo Pesquero", P.Arana (Ed.), Escuela de Ciencias del Mar, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso. 59-68.

Gutierrez, V.H. 2003. Rheological and organoleptic factors of *Loxechinus albus* from the coast of Chile. Page 171 in Lawrence, J., editor. Sea Urchins. Fisheries and Ecology. Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture. Puerto Varas, Chile, 25-27 March 2003. DEStech Publications, Inc, Lancaster, Pennsylvania, USA.

Holland, N.D & L.Z, Holland. 1969. Annual cycle in the germinal and nongerminal cell population in the gonads of the sea urchin, *Psammenchinus microtuberculatus*. Publishing Statz Zoology Napoly, 37: 394-404.

Larrain, A. 1975. Los equinoideos regulares fósiles y recientes de Chile. Gayana Zoología, 35: 1-189.

Lawrence, J. M., Fenaux, L., Lawrence, A.L. & M.C. Corre. 1992. The effect of quantity and quality of prepared diets on productions in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). Page 107-110 in Scalera-Liaci, L. & C. Canicatti, editor. Echinoderm Research 1991. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.

Lawrence, J. M., Olave, S., Otaíza, R., Lawrence, A. & E. Bustos. 1997. Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. Journal World Aquaculture Society, 28: 91-96.

Martoja, R. & M. Martoja-Pierson. 1973. Técnicas de histología animal. Editorial Toray-Masson, S.A. Barcelona, España. 350pp.

Nicotra, A. & A. Serafino. 1998. Ultrastructural observations on the interstitial cells of the testes of *Paracentrotus lividus*. Journal of Invertebrates Reproduction and Development, 13: 239-250

Olave, S., Bustos, E., Lawrence, J. & P. Cárcamo. 2001. The effect of size and diet on gonad production by the Chilean sea urchin *Loxechinus albus*. Journal World Aquaculture Society, 32: 210-214.

Olivarez, I. 2003. Characterization of the gametogenic cycle of the sea urchin *Loxechinus albus*. Page 179-184 in Lawrence, J., editor. Sea Urchins. Fisheries and Ecology. Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture. Puerto Varas, Chile, 25-27 March 2003. DEStech Publications, Inc, Lancaster, Pennsylvania, USA.

Pantazis, P., Kelly, M., Connolly, J. & K. Black. 2000. Effect of artificial diets on growth, lipid utilization and gonad biochemistry in the adult sea urchin *Pasammechinus miliaris*. Journal of Shellfish Research, 19: 995-1001

Pearce, C., Dagget, T. & S. Robinson. 2002. Effect of protein source ratio and protein concentration in prepared diets on gonad yield and quality of the green sea urchins, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Aquaculture, 214: 307-332

Pearse, J.S. 1969. Reproductive periodicities of Indo-Pacific invertebrates in the Gulf of Suez. II. The echinoid *Echinometra mathei* (DeBlainville). Bulletin Marine Science, 19: 580-613

Pearse, J. S. & R. A. Cameron. 1991. Echinodermata: Echinoidea. Page 512-612 in A. C. Giese, J. S. Pearse & V. B. Pearse (eds). Reproduction of Marine Invertebrates, vol. VI. Boxwood Press, Pacific Grove, California.

Sepulveda, J. 2001. Estudio nutricional y asignacion de energia en *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinodermata : Echinoidea), alimnetado con dos dietas formuladas. Tésis de título. Universidad Católica del Norte. Chile. 56pp.

Shaw, B. & H. Battle. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Canadian Journal of Zoology, 35: 325-347.

Vidal, G. 2003. Use of artificial diets in the culture of the sea urchin *Loxechinus albus* . Page 230-237 in Lawrence, J., editor. Sea Urchins. Fisheries and Ecology. Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture. Puerto Varas, Chile, 25-27 March 2003. DEStech Publications, Inc, Lancaster, Pennsylvania, USA.

Yañez, A. & J. Castillo. 1973. Análisis cuali y cuantitativo de los Equinodermos de los fondos sublitorales blandos de la Bahia de Concepcion. Chile. Gayana, 25: 10-11

Yoshida, M. 1952. Some observations on the maturation of the sea urchin, *Diadema satosum*. Annotation Zoology Japanese, 25:265-271.

Zamora, S. & W. Stotz. 1992. Ciclo reproductivo de el *Loxechinus albus* (Molina 1872) (Echinodermata: Echinoidea), en Punta Lagunillas, IV Region, Coquimbo, Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 65:121-133.

Tabla I: Composición proximal de las 6 dietas artificiales ingeridas por los erizos.

Composición Proximal (g/100g)						
DIETAS	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
PROTEINAS	15,000	15,002	14,998	14,998	14,998	25,001
LIPIDOS	5	5	5	5	5	5
CARBOHIDRATOS	70-75	70-75	70-75	70-75	70-75	60-65
CENIZAS	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10
VITAMINAS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
MINERALES	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
AMINOACIDOS						
Acido Aspártico	0,021	1,644	0,833	0,833	0,833	1,388
Treonina	0,096	0,809	0,452	0,452	0,452	0,754
Serina	0,085	0,734	0,409	0,409	0,409	0,682
Acido Glutámico	12,707	1,796	7,251	7,251	7,251	12,086
Glutamina	0,127	0,000	0,064	0,064	0,064	0,106
Prolina	0,966	0,683	0,824	0,824	0,824	1,374
Glicina	0,042	0,911	0,477	0,477	0,477	0,794
Alanina	0,340	1,113	0,726	0,726	0,726	1,211
Cisteina	0,074	0,177	0,126	0,126	0,126	0,209
Valina	0,074	0,835	0,455	0,455	0,455	0,758
Metionina	0,064	0,531	0,297	0,297	0,297	0,496
Isoleucina	0,053	0,658	0,355	0,355	0,355	0,592
Leucina	0,064	1,341	0,702	0,702	0,702	1,170
Tirosina	0,064	0,506	0,285	0,285	0,285	0,475
Fenilalanina	0,074	0,860	0,467	0,467	0,467	0,779
Lisina	0,053	0,936	0,494	0,494	0,494	0,824
Histidina	0,032	0,329	0,180	0,180	0,180	0,301
Arginina	0,053	0,835	0,444	0,444	0,444	0,740
Triptofano	0,011	0,304	0,157	0,157	0,157	0,262
PIGMENTOS						
β-equinona	1,0	1,0	1,0	2,0	0,0	1,0
β -caroteno	1,0	1,0	1,0	0,0	2,0	1,0

Tabla II: Promedio de ovocitos de las hembras en cada tratamiento, para octubre, noviembre y diciembre.

TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	Promedio
Diámetro promedio ovocito octubre	85.43± 13.28	85.49± 11.81	86.85± 12.07	89.0± 13.58	88.17± 14.22	92.66± 11.49	92.11± 13.25	85.43±13.2
Diámetro promedio ovocito noviembre	91.11± 12.30	93.8± 11.21	91.86± 13.03	90.1± 13.77	85.98± 15.06	86.81± 14.06	87.56± 16.35	89.58±13.9
Diámetro promedio ovocito diciembre	92.98± 13.02	87.81± 19.23	93.23± 13.09	96.6± 9.41	95.69± 8.42	93.47± 9.62	91.68± 8.57	93.13±12.4

Tabla III: Valores de Índice de madurez gonadal (IMG) para machos y hembras en cada tratamiento, para octubre, noviembre y diciembre.

IMG	octubre		noviembre		diciembre	
Tratamiento	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
1	3,046	2,884	3,134	2,870	3,905	2,571
2	2,851	2,756	2,607	3,039	3,171	2,094
3	3,708	2,153	3,427	2,349	2,8	2,004
4	2,978	2,8	2,560	1,956	2,413	1,85
5	3,233	2,433	3,491	3,147	2,527	2,365
6	3,574	2,333	3,818	2,292	3,333	1,783
Control	2,733	2,842	3,209	3,515	2,630	1,863

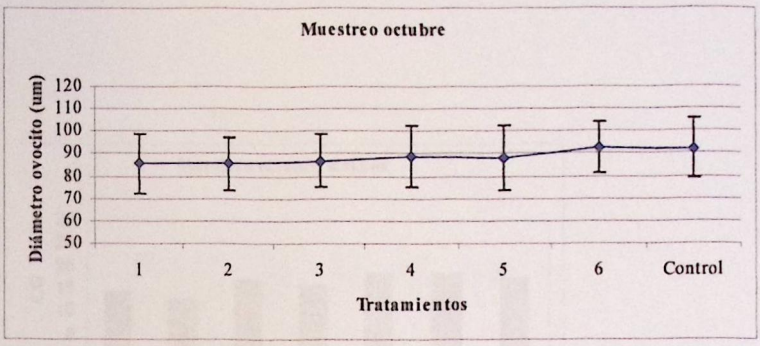


Figura 1: Distribución de frecuencias de tamaños de ovocitos (um) en los tratamientos, en octubre.

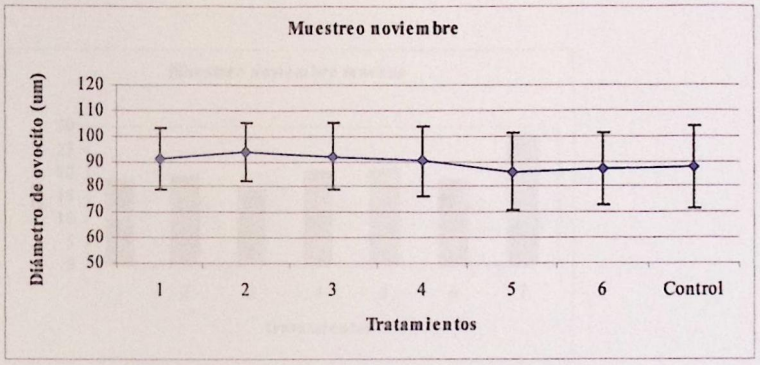


Figura 2: Distribución de frecuencias de tamaños de ovocitos (um) en los tratamientos, en noviembre.

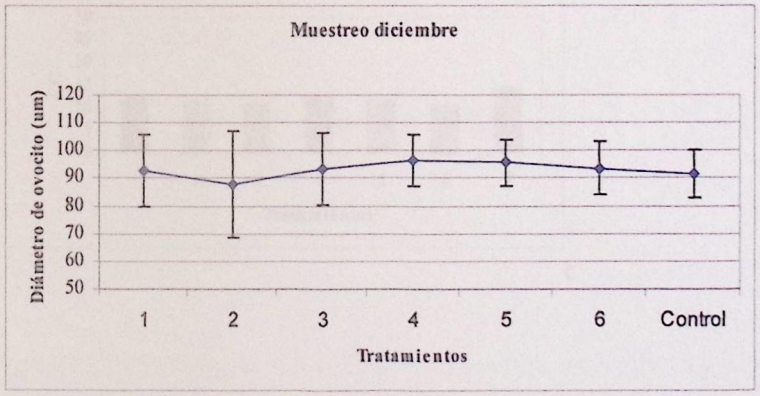
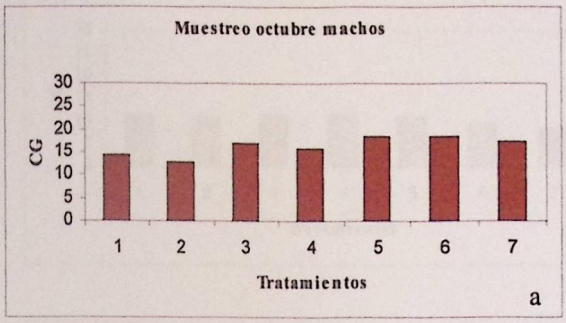


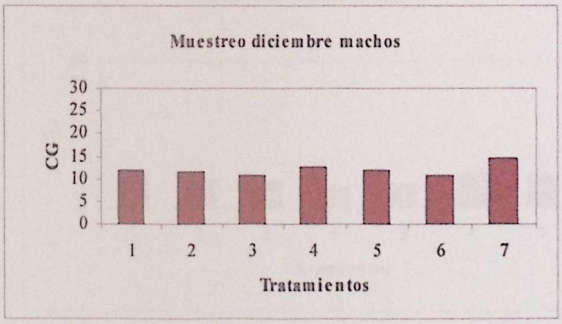
Figura 3: Distribución de frecuencias de tamaños de ovocitos (um) en los tratamientos, en diciembre.



a

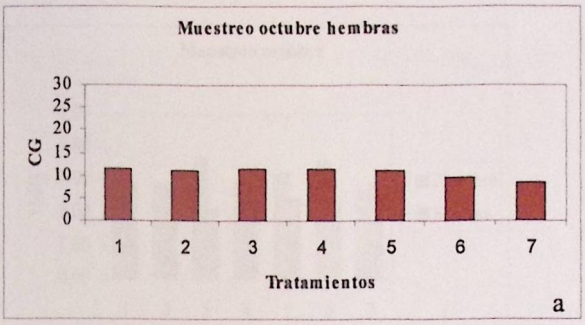


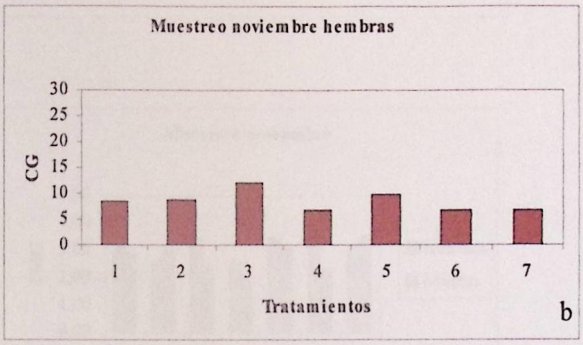
b



c

Figura 4: Coeficiente gamético (CG) para los machos, en octubre (a), noviembre (b) y diciembre (c).





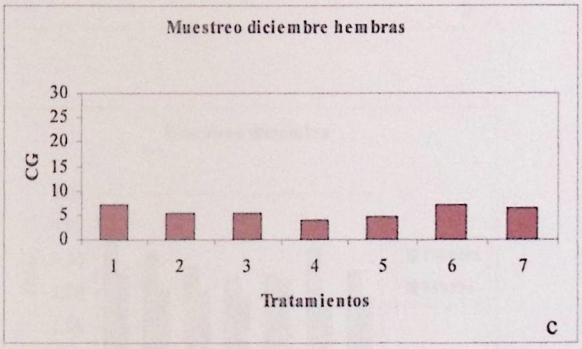
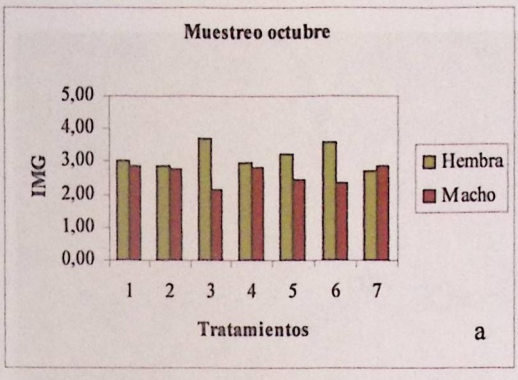
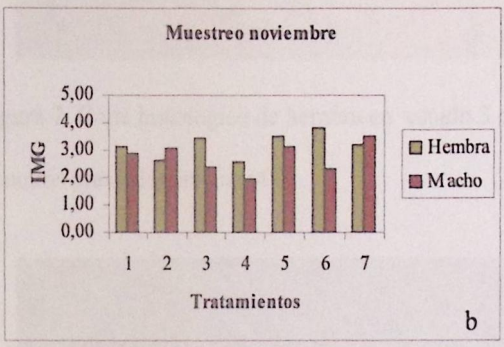


Figura 5: Coeficiente gamético (CG) para las hembras, en octubre (a), noviembre (b) y diciembre (c).





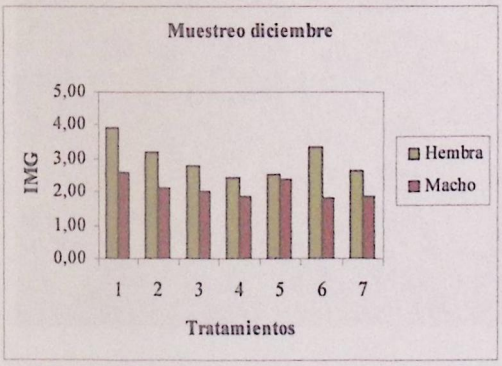


Figura 6: Índice de madurez gonádico (IMG) para hembras y machos en los tratamientos, en octubre (a), noviembre (b) y diciembre (c).

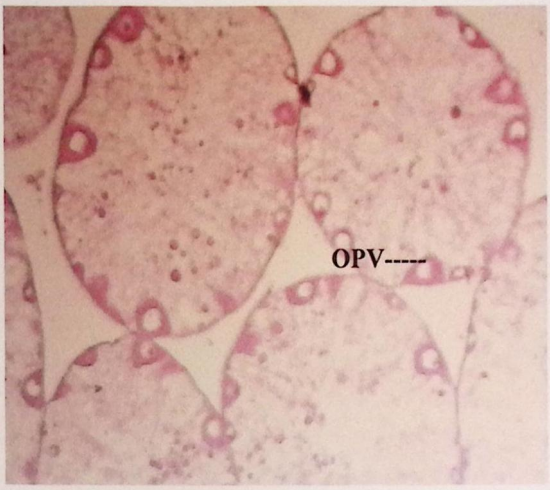


Figura 7: Corte histológico de hembra en estado 3 de desarrollo gonádico. OPV= ovocitos previtelogénicos. (4x)



Figura 8: Acino de hembra en estado 4 de desarrollo gonádico. OV= ovocitos vitelogénicos. (4x)

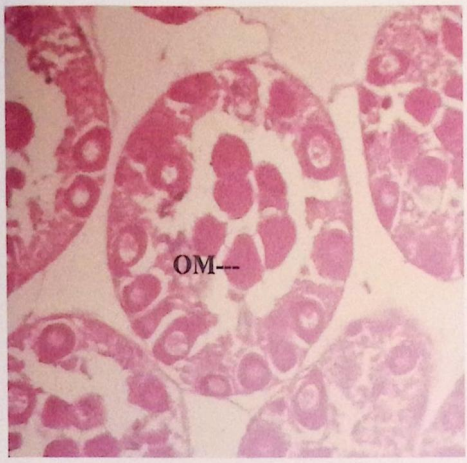


Figura 9: Acino de hembra en estado 5 de desarrollo gonádico. OM= ovocitos maduros. (4x)

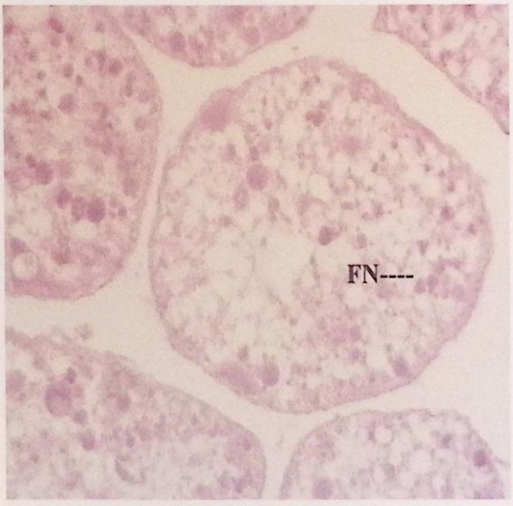


Figura 10: Acino de hembra en estado 1 de desarrollo gonádico. FN= fagocitos nutritivos. (10x)

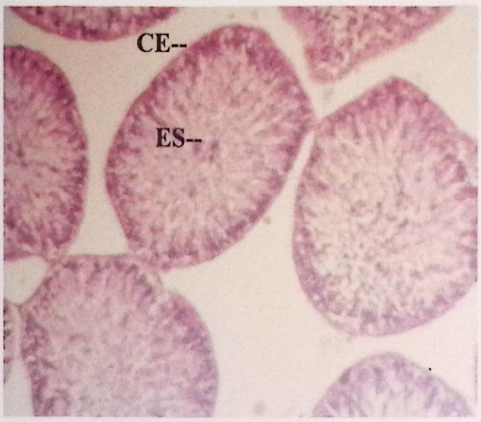


Figura 11: Macho en estado 3 de desarrollo gonádico. ES= espermatozoides, CE= columna espermatogénica. (4x)

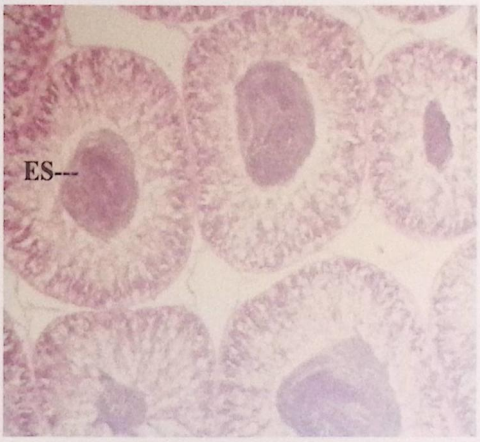


Figura 12: Macho en estado de desarrollo gonádico 4. ES= espermatozoides. (4X)



Figura 13: Macho en estado 5 de desarrollo gonádico. ES= espermatozoides, CE= columna espermatogénica. (4x)

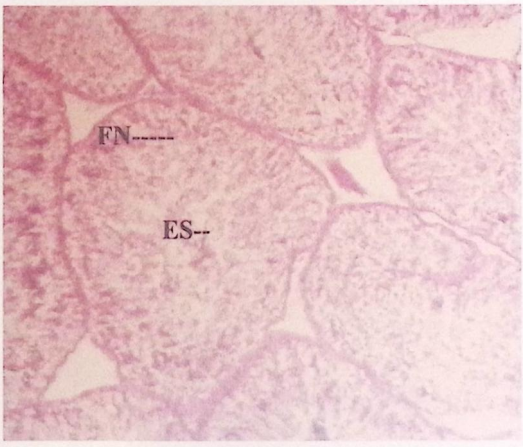


Figura 14: Corte histológico de macho en estado de desarrollo 1. Espermatozoides en proceso de reabsorción. FN= fagocitos nutritivos, ES= espermatozoides. (4x)

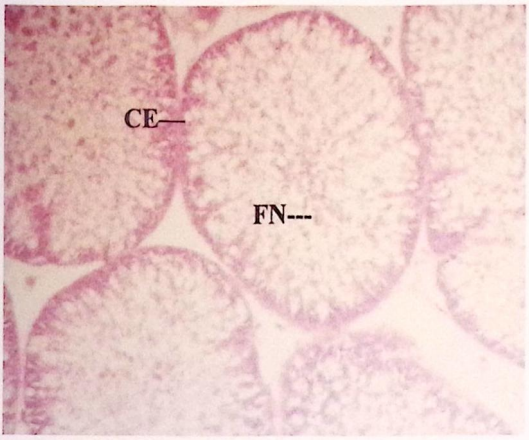


Figura 15: Macho en estado de desarrollo gonádico 2. CE= columna espermatogénica, FN= fagocitos nutritivos. (4x)