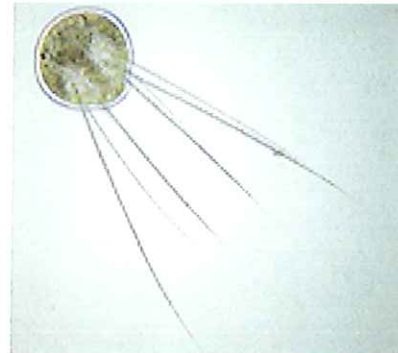


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**" BIOLOGIA LARVAL Y EFECTO DEL FOTOPERIODO EN LA  
MADURACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE  
*Pareurythoe californica* (Johnson, 1897)  
POLIQUETA: AMPHINOMIDAE"**



**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
OCEANOLOGO  
PRESENTA  
JOAQUIN OMAR SAAVEDRA LUNA**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MARZO DEL 2003**

" BIOLOGIA LARVAL Y EFECTO DEL FOTOPERIODO EN LA  
MADURACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE  
*Pareurythoe californica* (Johnson, 1897)  
POLIQUETA: AMPHINOMIDAE"

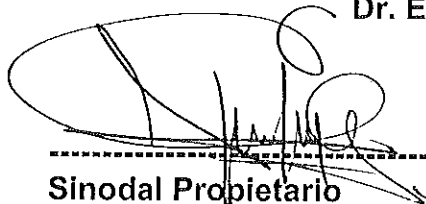
T E S I S  
QUE PRESENTA:

JOAQUÍN OMAR SAAVEDRA LUNA

Aprobada por:



Presidente del Jurado  
Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte



Sinodal Propietario  
M.C. Alfredo Ernesto Salas Garza



Sinodal Propietario  
M.C. Conal David True

## DEDICATORIA

A Dios y a mi Sad Guru por darme fuerza, perseverancia y paciencia. Porque en los momentos más difíciles siempre me hizo dar un nuevo respiro para después seguir adelante sin darme por vencido y por darme la oportunidad de descubrir un poco de esa infinita belleza que guarda la naturaleza.

So ham

A mis padres Silvia Luna Perrusquia y Joaquín Saavedra Flores porque esta tesis es el resultado de su esfuerzo y apoyo en todo momento. Por sus consejos y los principios que me han dado y por creer en mí y en mis ideales siempre.

A mi amada esposa Pilar Flores Patiño por todo el amor, comprensión, compañía y ayuda que ha sido tan importante para realizar esta tesis y mi carrera. Por sus consejos, por su madurez y por su gran fuerza que me han ayudado a salir adelante y ser una mejor persona.

A mis queridas hermanas Isis y Miriam porque siempre he recibido de ustedes amor, apoyo y consejos para seguir con mis metas. A mi abuelo Guadalupe Luna por su apoyo y su cariño. A mi querido sobrino Gerardo por la alegría y la esperanza que me transmite. A mis tías Marina, Juani y Esther por su amor. A mi primo hermano Rubén por brindarme su amistad y cariño siempre dondequiera que nos encontremos. A mis amigos Rodrigo, Alberto, Vanesa y Gonzalo por brindarme siempre su invaluable amistad y apoyo de hermanos.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte por todo el apoyo, por sus valiosos consejos, por su comprensión, por su amistad y por despertar en mi esa pasión por la ciencia y enseñarme a desarrollar sistemática y meticulosamente ese invaluable conocimiento.

A mis sinodales M.C. Alfredo Ernesto Salas Garza y M.C. David Conal True por sus valiosas sugerencias y por su apoyo que contribuyeron a hacer de este un mejor trabajo.

A todos los investigadores que contribuyeron en algún momento de este trabajo: Al Dr. Antonio Trujillo por brindarme su tiempo y su apoyo en el análisis estadístico. A la M.C. Verónica Rodríguez por su apoyo en la identificación de la especie. A Meredith C. Gould y José Luis Sthepano por sus valiosas aportaciones y apoyo en la tinción de cromosomas en ovocitos. A la Dra. Dora Waumann y a la Dra. Victoria Díaz por despertar en mi el interés por este tema de tesis y por sus aportaciones. A la Dra. Lus M. López A. por su apoyo con el alimento de los organismos adultos. Al M.C. Enrique Valenzuela por el apoyo con las microalgas. Al Dr. Leopoldo Mendoza y al equipo de calidad del agua de IIO. Al M.C. Gerardo Amador por su apoyo en las imágenes fotográficas y por sus consejos. A la M.C. Griselda Parés S. y a la Oc. Dora Cristino por su amistad y apoyo. Al Técnico del laboratorio Agustín Hernández por su apoyo y consejos y a todo el equipo del laboratorio de embriología que siempre me hizo sentir como en casa.

# I N D I C E

	<i>Página</i>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1 Maduración y crecimiento.....	4
2.2 Desarrollo larvario.....	7
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>10</b>
3.1 Objetivos particulares.....	10
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
4.1 Colecta.....	11
4.2 Experimento de fotoperiodo.....	11
4.2.1 Diseño experimental.....	11
4.2.2 Sistema de cultivo experimental.....	15
4.2.3 Peso húmedo individual.....	15
4.2.4 Alimentación.....	16
4.2.5 Medición de variables.....	17
4.2.6 Extracción de gametos.....	17
4.2.6.1 Evaluación de ovocitos.....	18
4.2.6.2 Evaluación de espermias.....	18
4.3 Resultados adicionales.....	19
4.4 Inducción al desove.....	19
4.4.1 "Desecación".....	20
4.4.2 "Shock térmico".....	20
4.4.3 "Shock térmico" y "Desecación".....	21
4.4 Fecundidad.....	21
4.5 Estimación de la maduración.....	22
4.5.1 Tinción de cromosomas con bisbenzimida.....	22
4.5.2 Tinción de cromosomas con orceina.....	22
4.6 Desarrollo larvario.....	23

4.7 Cultivo larvario.....	23
4.8 Inducción a la metamorfosis con KCl.....	24
4.9 Análisis estadístico.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 Efecto del fotoperiodo en la maduración.....	27
5.1.1 Diámetro promedio de ovocito .....	27
5.1.2 Distribución del diámetro de ovocito por individuo.....	30
5.1.3 Frecuencia del diámetro de los ovocitos.....	32
5.1.4 Frecuencia del diámetro de los ovocitos por intervalo de peso	35
5.1.5 Motilidad espermática.....	41
5.2 Efecto del fotoperiodo en el crecimiento.....	43
5.3 Proporción de sexos durante el experimento.....	45
5.4 Medición de variables.....	48
5.5 Resultados adicionales.....	52
5.5.1 Estimación de peso individual en el medio natural.....	52
5.5.2 Peso por individuo en organismos mantenidos en laboratorio.....	54
5.5.3 Crecimiento de ovocitos en organismos mantenidos en laboratorio.....	54
5.6 Inducción al desove y fecundidad.....	55
5.7 Tinción de cromosomas.....	59
5.8 Desarrollo embrionario y larvario.....	59
5.8.1 Desarrollo embrionario.....	59
5.8.2 Desarrollo larvario.....	62
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
6.1 Efecto del fotoperiodo.....	66
6.1.1 Maduración y crecimiento.....	66
6.1.2 Fecundidad.....	73
6.1.3 Tinción de cromosomas.....	75
6.2 Periodo larvario.....	77

## L I S T A D E F I G U R A S

		<i>Página</i>
<b>Fig. 1</b>	Diseño del experimento de fotoperiodo donde se presentan las 18 unidades experimentales de los dos tratamientos.....	13
<b>Fig. 2</b>	Unidad experimental.....	14
<b>Fig. 3</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Diámetro promedio de ovocito ( $\mu\text{m}$ ) obtenido durante las tres evaluaciones realizadas en el experimento de fotoperiodo.....	29
<b>Fig. 4</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Efecto del fotoperiodo evaluado a través del crecimiento de los ovocitos.....	31
<b>Fig. 5</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Efecto poblacional del experimento de fotoperiodo en la frecuencia del diámetro de ovocito para los tratamientos de fotoperiodo LO 0:24 y LO 12.12.....	33
<b>Fig. 6</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Frecuencia de diámetro de ovocito al inicio del experimento de fotoperiodo (octubre 01) para los tres intervalos de peso en que se agruparon los organismos.....	36
<b>Fig. 7</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Efecto del fotoperiodo en el diámetro de los ovocitos después de dos meses de exposición (diciembre 01) a los tratamientos de fotoperiodo.....	38
<b>Fig. 8</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Efecto del fotoperiodo en el diámetro de los ovocitos después de cuatro meses (febrero 01) de exposición a los tratamientos de fotoperiodo.....	40
<b>Fig. 9</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Motilidad espermática.....	42
<b>Fig. 10</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Peso húmedo de los poliquetos en las tres evaluaciones realizadas durante el experimento de fotoperiodo.....	44
<b>Fig. 11</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Adultos de ambos sexos.....	46

<b>Fig. 12</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Proporción de sexos durante el experimento de fotoperiodo.....	47
<b>Fig. 13</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Máximos y mínimos de temperatura en el agua de mar de los frascos de cultivo durante el experimento de fotoperiodo.....	50
<b>Fig. 14</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Concentración media de oxígeno disuelto en el agua de mar de los recipientes de cultivo durante la alimentación.....	51
<b>Fig. 15</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Distribución de peso húmedo de los poliquetos evaluada del medio natural en marzo y octubre y de organismos mantenidos en laboratorio de marzo a septiembre.....	53
<b>Fig. 16</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Crecimiento de ovocito evaluado a organismos mantenidos en el laboratorio de marzo a septiembre.....	56
<b>Fig. 17</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Fecundidad estimada a poliquetos desobados bajo las condiciones del experimento de inducción al desove: "Desecación" y "Shock térmico".....	58
<b>Fig. 18</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Tinción de cromosomas con Bisbenzimidida y con Orceína a ovocitos de distintos diámetros.....	60
<b>Fig. 19</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Desarrollo embrionario.....	61
<b>Fig. 20</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Desarrollo larvario (parte 1).....	63
<b>Fig. 21</b>	<i>Pareurythoe californica</i> . Desarrollo larvario. (parte 2).....	64

## L I S T A D E T A B L A S

	<i>Página</i>
<b>Tabla I</b> Contenido nutricional del alimento para pez marca EWOS.....	16
<b>Tabla II</b> Resultados estadísticos del diámetro promedio de ovocito por ANOVA de tres factores.....	88
<b>Tabla III</b> Resultados estadísticos del diámetro promedio de ovocito en la prueba a posteriori por Tukey.....	88
<b>Tabla IV</b> Resultados estadísticos de la frecuencia de los individuos en el diámetro de los ovocitos mediante un análisis Log-lineal por tablas de contingencia.....	89
<b>Tabla V</b> Resultados estadísticos de la frecuencia del diámetro de los ovocitos mediante un análisis Log-lineal por tablas de contingencia.....	90
<b>Tabla VI</b> Resultados estadísticos de la frecuencia del diámetro de los ovocitos por intervalo de peso mediante un análisis Log-lineal por tablas de contingencia.....	91
<b>Tabla VII</b> Experimentos de inducción al desove.....	57

## R E S U M E N

Con el objeto de generar conocimientos sobre la maduración, el crecimiento y el desarrollo larvario del poliqueto *Pareurythoe californica*, se colectaron organismos de la zona intermareal y se mantuvieron en el laboratorio. Con estos poliquetos se llevó a cabo un experimento para evaluar el efecto del fotoperiodo en la maduración y el crecimiento de los organismos sometiéndolos a dos diferentes condiciones de fotoperiodo; un tratamiento de 24 horas de obscuridad y otro de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad. El grado de madurez de los poliquetos se evaluó a través de la medición del diámetro de los ovocitos y la motilidad espermática. El crecimiento de los organismos se evaluó a través del incremento en peso de los organismos. El experimento se llevó a cabo durante cuatro meses y los organismos se evaluaron individualmente cada dos meses. En ambos tratamientos ocurrió la gametogénesis. Sin embargo en el tratamiento de 12 horas de luz y 12 de obscuridad se observó una tendencia a producir ovocitos de mayor tamaño ó más rápidamente. En contraste, en el fotoperiodo de total obscuridad hubo un mayor peso promedio al final del experimento. Por otra parte con organismos maduros fue posible realizar desoves en el laboratorio. En su condición inmadura, los organismos presentan los segmentos abdominales de color rosado y no es posible sexarlos a simple vista. Por el contrario, en su condición madura, las hembras adquieren un tono rosado oscuro debido a que desarrollan ovocitos color rosa en el celoma y en los machos se observa que los segmentos abdominales adquieren un tono rosado blanquecino debido a que desarrollan espermias. Los ovocitos son de forma convexa que semeja un platillo y son desovados en estadio profase de meiosis. El diámetro promedio de ovocito maduro fue de  $90\mu\text{m}$  con un máximo de  $100\mu\text{m}$ . La primera división celular se observó dos horas y media postfertilización (pf.) ; la segunda división celular se documentó cuatro horas pf. y el estadio mórula 17 horas pf; el estadio blástula se visualizó 24 horas pf; el estadio gástrula avanzada se observó tres días pf; el cuarto día se desarrollaron dos manchas oculares en la porción anterior y un par de quetas de  $40\mu\text{m}$  ubicadas en la porción posterior; el quinto día se desarrollaron dos pares de quetas de  $200\mu\text{m}$ ; a partir del sexto día se observó la aparición de la boca y el comienzo del largó proceso de

elongación desarrollándose una larva nectoqueta planctotrófica. La larva fue mantenida hasta dos meses sin llegar a la metamorfosis.

## 1. INTRODUCCION

Los anélidos poliquetos comprenden más de 15000 especies descritas con 80 familias ( Fauchald y Rouse, 1997). Constituyen entre el 30% y 60% de las especies del macrobentos que habitan sustratos blandos. Un número menor pero abundante se encuentran en las costas rocosas (Salazar, 1988). Por lo tanto los poliquetos son un componente importante en la cadena alimenticia de las comunidades bentónicas y forman parte de la dieta de diversas especies de importancia comercial.

Además de ser un componente importante en el bentos marino los poliquetos han sido utilizados por el hombre desde hace mucho tiempo (Brown, 1993). Entre otras cosas han sido utilizados como indicadores de contaminación en estudios de impacto ambiental al cuantificar a través de ellos los efectos de diversos contaminantes en las costas. En los años 70 fueron seleccionados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (E.U.A) como uno de los grupos de organismos factibles de utilizarse con estos fines en bioensayos con adultos y larvas en diferentes estadios de desarrollo (Smith y Chanley, 1975).

México cuenta con una extensa franja costera que contiene una diversidad de hábitats donde existen gran cantidad de especies de poliquetos

con potencial de aprovechamiento. En la mayoría de los casos se desconoce sobre las posibilidades de su cultivo. Debido a lo anterior es importante realizar estudios sobre su biología reproductiva y desarrollo larvario para implementar biotecnologías que se apliquen en el desarrollo de su cultivo.

Su uso como carnada en la pesca deportiva ha creado demanda económica desde finales de los años cuarenta. En Europa y en las costas de Maine, E.U.A. se han explotado poblaciones de poliquetos nereidos y glyceridos. Incluso la sobreexplotación del glycerido *Glycera dibranchata* en la costa del noreste de E.U.A. ha causado decrementos importantes en las poblaciones naturales (Brown, 1993).

En la acuicultura los poliquetos son utilizados como ingrediente en las dietas para maduración de reproductores de camarón en granjas productoras de postlarva (Pinon, 2000). En el mismo trabajo el autor menciona que los poliquetos tienen un papel importante en la maduración debido a su alto contenido de proteínas y a su alta concentración de ácidos grasos insaturados (HUFAs) que son esenciales para muchos organismos marinos. Además su suave cutícula los hace muy palatables y fáciles de consumir para los camarones. En Ecuador han sido utilizados en granjas productoras de postlarva de camarón con buenos resultados (Pinon, 2000).

Debido a la necesidad de abastecer la demanda de poliquetos utilizados como carnada en la pesca y como alimento en acuicultura, hace varias décadas que se comenzaron en Europa los estudios de factibilidad para su producción con fines comerciales. La compañía Seabait Ltd. en Reino Unido comenzó el cultivo comercial del nereido *Nereis virens* en 1985 (Pinon, 2000).

En Baja California no existen estudios encaminados a evaluar especies de poliquetos con fines productivos. En un esfuerzo inicial por obtener especies locales se muestrearon poliquetos de las familias Polynoidae, Phyllodocidae y Amphinominidae. La especie *Pareurythoe californica* (Johnson, 1897) Amphinomidae (Lamarck, 1818) resultó la más fácil de adaptar a condiciones de laboratorio. Esta especie es abundante en el medio, fácil de colectar, manejar en laboratorio y es posible la obtención de sus gametos. El presente trabajo pretende generar conocimientos acerca de su maduración en condiciones de laboratorio y su desarrollo larvario.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Maduración y crecimiento

En estudios de maduración en laboratorio con el poliqueto *Nereis (Neanthes) virens* se ha comprobado que el fotoperiodo influencia la ovogénesis, cuantificando esta mediante el crecimiento del diámetro de los ovocitos (Olive et al., 1998). En la misma especie se ha documentado que el fotoperiodo también influencia el crecimiento somático de los organismos (Last y Olive, 1999). Diversos estudios sobre el efecto del fotoperiodo en invertebrados marinos se han basado en la respuesta de estos organismos en relación con su actividad reproductiva relacionándola con los cambios de fase durante el año solar (Olive et al., 1998). Comúnmente el ciclo de la actividad reproductiva en poliquetos es anual. En algunas especies se ha reportado actividad reproductiva en diferentes ciclos lunares (Olive, 1984).

Estudios experimentales con poliquetos mostraron que cambiando condiciones ambientales como fotoperiodo y temperatura se puede influenciar el proceso de gametogénesis y promover una sincronización reproductiva (Olive, 1984). En el nereido *Nereis Neanthes limnicola* la sincronización reproductiva es influenciada por control ambiental. En estos organismos la ritmicidad circ-anual endógena juega un papel importante en mantener los

patrones de desove (Fong y Pearse, 1992a). En *N. (N.) virens* los cambios en la actividad endócrina son una respuesta a los cambios en la actividad fisiológica inducida inicialmente por el fotoperiodo (Olive et al., 1998).

Ensayos "in vitro" han demostrado que la ovogénesis en el polinoideo *Harmothoe imbricata* es controlada por una hormona que promueve el desarrollo de los ovocitos. Un control similar endocrino fue encontrado en el phyllodocido *Eulalia viridis*. Análisis "in vivo" indicaron que esta hormona actúa como transductor entre el medio ambiente y los gametos. Esta hormona es secretada solamente bajo los regímenes apropiados de fotoperiodo y temperatura (Lawrence, 1996).

En *Arenicola marina* la sincronización reproductiva puede ser vista en dos niveles; la sincronización en la maduración de los gametos y la sincronización del desove (Watson et al., 2000a). En el mismo trabajo el autor menciona que una menor variación en el tamaño de los ovocitos de esta especie indica un incremento en la sincronización de la ovogénesis. Esta sincronización es iniciada y regulada por condiciones medioambientales. Cuando los organismos están completamente maduros las condiciones ambientales una vez más juegan el papel principal como detonadores del desove. En *A. marina* el fotoperiodo juega un papel menor ya que estos organismos no tienen ojos o estructuras similares que resulten sensibles a la

luz. Sin embargo los incrementos en la temperatura si afectan la gametogénesis directamente (Watson et al., 2000a).

Con la finalidad de documentar el estadio de meiosis en el cual se encuentran los ovocitos de diversos invertebrados en sus distintos estadios de desarrollo se han utilizado diversos métodos de tinción de cromosomas (Stephano y Gould, 1981; Harris et al., 2002 ).

En anélidos el crecimiento somático consiste de la proliferación de segmentos proveniente de una zona de crecimiento activa enfrente del pigidio, seguido de un alargamiento de los nuevos segmentos (Highnam y Hill, 1969). En la mayoría de los poliquetos el crecimiento al principio de su desarrollo es rápido con una alta tasa de proliferación de segmentos. Al final de su desarrollo esta tasa de crecimiento disminuye considerablemente. La vitelogénesis y la maduración final de los gametos ocurre durante este último periodo de crecimiento somático. En esta etapa de desarrollo los nutrientes utilizados en crecimiento somático son transferidos al proceso de gametogénesis. Esta transferencia de nutrientes es promovida por hormonas (Highnam y Hill, 1969).

En lo que respecta al efecto del fotoperíodo en el crecimiento se ha comprobado que en el poliqueto *N. (N.) virens* el fotoperíodo ejerce influencia directa sobre el crecimiento y provoca una interacción entre el crecimiento y el

proceso de maduración (Last y Olive, 1999). En esta especie el cambio de fotoperiodo en el otoño tiene dos efectos importantes; una reducción en la búsqueda del alimento y un rápido crecimiento de ovocitos (Olive et al., 1998).

## 2.2 Desarrollo larvario

De las 15000 especies de poliquetos descritas en la actualidad solamente se conoce detalladamente el ciclo de vida del 3% de ellas. (Giangrande, 1997; Eckelbarger et al., 2001). La mayoría de los estudios realizados sobre embriología y biología larval en poliquetos han sido de especies del Atlántico y Mediterráneo.

En la región Pacífico Norte existen muchas especies que aún no han sido descritas (Strathmann, 1987). Este mismo autor señala que las especies locales presentan una notable variedad de modelos reproductivos. Los sexos son separados en muchas especies, pero el hermafroditismo es típico en algunos grupos.

En una misma familia pueden existir diferentes modos reproductivos. En la familia Terebellidae los poliquetos *Eupolyornia crescentis* y *Neoamphitrite robusta* desovan libremente en el bentos y sus larvas son de desarrollo planctotrófico mientras que *Thelepus crispus* y *Ramex californiensis* incuban

sus huevecillos y son de desarrollo directo (McHugh,1993). Incluso en un mismo género pueden haber distintos tipos de desarrollo. En la familia Spionidae el poliqueto *Streblospio shrubsolii* es de desarrollo directo, el poliqueto *S. n.sp.* es de desarrollo planctotrófico y el poliqueto *S. benedicti* puede producir embriones tanto de desarrollo directo como planctotrófico (Bridges, 1993).

En los últimos cuatro años se ha descrito el desarrollo larvario de especies herrantes como el Polinoideo; *Branchiopolynoe seepensis* (Jollivet et al., 2000) y el Hesionido; *Hesioacaeca methaniciola* (Eckelbarger et al., 2001) que habitan chimeneas hidrotermales. El Spionido; *Dipolydora armata* (Lewis, 1998) que habita hidrozoarios calcáreos y el Sabellido; *Sabella spallanzanii* (Giangrande et al., 2000) que habita las costas del Mediterráneo. *Pareurythoe californica* es una especie de sexos separados sin dimorfismo sexual y desarrolla una larva trocófora planctotrófica. Este trabajo pretende describir el desarrollo temprano y larvario de la especie. La familia Amphinomidae posee un tipo de larva llamada "rostraria" que se conoce sólo de muestras de plancton y no ha sido cultivada hasta la metamorfosis en laboratorio (Pernet et al., 2002).

Los resultados mas exitosos sobre fertilización y desarrollo con poliquetos han sido documentados cuando los poliquetos desovan espontáneamente en laboratorio. Incluso en algunas especies de nereidos y

capitelidos es el único camino para lograr una fertilización exitosa (Reish, 1974). En el citado trabajo Reish menciona que poliquetos como *Stauronereis rudolphi* y *Halosydna brevisetosa* han sido inducidos al desove exitosamente después de haber sido colectados y transferidos en agua de mar entre 15 C° y 22 C° lográndose una fertilización y un desarrollo normal. En condiciones de laboratorio también fueron desovados al ser transferidos de 9 a 17 C° - 22 C°. Reish menciona que en algunas especies como *Halosydna brevisetosa* también es posible extraer gametos mediante disección con cierto grado de éxito en la fertilización y el desarrollo.

Los conocimientos adquiridos en la realización de esta tesis serán una aportación a la escasa información que se tiene sobre la biología reproductiva de los poliquetos que habitan la región del Pacífico Norte y contribuirán al desarrollo de biotecnologías en acuicultura de especies de poliquetos locales.

### 3. OBJETIVO GENERAL

- El presente trabajo tiene como objetivo generar conocimientos sobre la maduración, el crecimiento en cautiverio y el desarrollo larvario del poliqueto *Pareurythoe californica*.

#### 3.1 Objetivos particulares

1. Evaluar la influencia del fotoperiodo en la maduración y el crecimiento.
2. Documentar el desarrollo temprano y larvario de la especie.
3. Generar una metodología de manejo de larvas y adultos en laboratorio.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Colecta

Durante marea baja se colectaron 200 poliquetos de la especie *Pareurythoe californica* en la playa rocosa de la Bahía de Todos Santos en Ensenada B.C. frente al Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Los organismos resultaron particularmente abundantes debajo de rocas sobre sustrato arenoso. Se colectaron en bolsas de plástico y fueron trasladados inmediatamente al laboratorio de embriología del IIO. En el laboratorio se colocaron en un frasco de cuatro litros en agua de mar con aireación constante hasta su utilización en los distintos experimentos.

### 4.2 Experimento de fotoperiodo

#### 4.2.1 Diseño experimental

El experimento de fotoperiodo consistió en dos tratamientos. Un tratamiento en oscuridad total las 24 horas (LO 0:24; horas de exposición a luz (L): horas de exposición a oscuridad (O) ) y otro de un ciclo neutral con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (LO 12:12). Los organismos de cada tratamiento se agruparon en tres intervalos de peso y se utilizaron tres réplicas

para cada intervalo dando un total de 18 unidades experimentales. Cada una de las réplicas contuvo nueve poliquetos para un total de 162 poliquetos con 81 organismos por tratamiento de fotoperiodo (Fig. 1).

El cultivo de los organismos se llevó a cabo en frascos de vidrio de 1L.. Cada frasco contó con dos mangueras, una para el suministro de agua de mar con un recambio del 100% del volumen total del frasco cada cinco minutos y la otra para aireación por medio de una piedra difusora. En cada frasco se colocaron tres piedras de 2.5 cm de diámetro aproximadamente que sirvieron como refugio para los poliquetos (Fig. 2).

Los frascos de cultivo se cerraron herméticamente con una tapadera de malla metálica sujeta al frasco con cinturones de plástico. Los orificios por donde entraron las mangueras se sellaron con silicón para evitar que los poliquetos se salieran (Fig. 2). Los nueve frascos del tratamiento de fotoperiodo de obscuridad total se cubrieron con plástico negro para impedir la entrada de luz. Los nueve frascos restantes pertenecientes al tratamiento de fotoperiodo neutral se mantuvieron descubiertos.

Al inicio del experimento se registró el peso inicial (con una balanza de precisión de 0.01gr.) de los nueve poliquetos de cada unidad experimental y se colocaron en sus respectivos recipientes. La colocación de los recipientes experimentales se realizó mediante un sorteo al azar de su posición en la cama de cultivo (Fig.1).

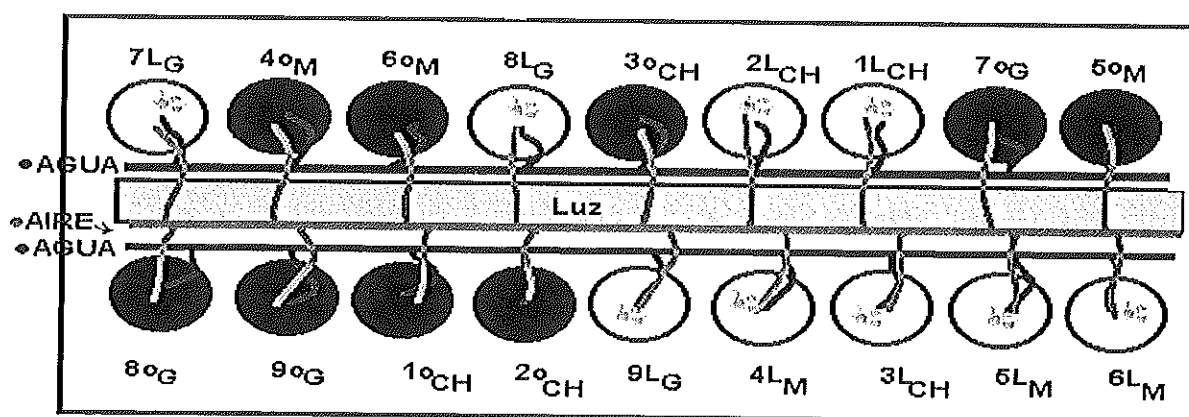


Fig.1. Diseño del experimento de fotoperiodo donde se presentan las 18 unidades experimentales de los dos tratamientos. Nueve recipientes negros: Fotoperiodo oscuridad total ; Nueve recipientes transparentes: fotoperiodo neutral. Divididos en: Talla chica: CH, (39 a 79 mg.) recipientes 1, 2 y 3. Talla mediana: M, (80 a 150 mg.) recipientes 4, 5 y 6. Talla grande: G, (151 a 330 mg.) recipientes 7, 8 y 9.

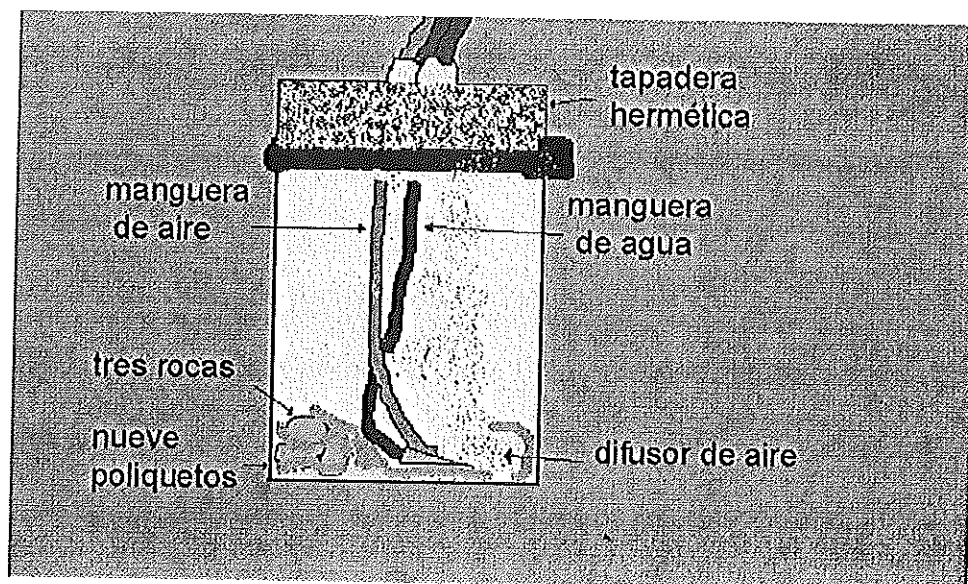


Fig.2. Unidad experimental donde se muestra un frasco de 1L donde se mantuvieron los organismos durante el experimento de fotoperiodo. Cada frasco tuvo un recambio del 100% de volumen total cada 5 min. y aireación constante.

El experimento descrito tuvo una duración de cuatro meses en los cuales se realizaron tres evaluaciones de gametos y peso húmedo. Al inicio (en octubre) a los dos meses (en diciembre) y a los cuatro meses (en febrero). El método utilizado en las evaluaciones de gametos y en las evaluaciones de peso húmedo se menciona en detalle en los incisos 4.2.3 y 4.2.6. La calidad del agua del cultivo se evaluó periódicamente midiendo la temperatura, oxígeno, pH y salinidad

#### **4.2.5 Medición de variables**

Durante el experimento se registraron diariamente máximos y mínimos de temperatura y se realizaron dos evaluaciones de la calidad del agua de los recipientes experimentales en el momento de alimentar a los organismos. Una al comienzo del experimento y otra al final. En estas evaluaciones se realizó una serie de tiempo de tres horas en la que se midió oxígeno (mg/l), pH y salinidad.

#### **4.2.6 Extracción de gametos**

Para la obtención de gametos se extrajeron individualmente los poliquetos de su recipiente experimental y se colocaron en una caja Petri con agua de mar filtrada. Esta se colocó en un microscopio estereoscópico marca Zeiss para facilitar la observación del organismo. Con ayuda de una pinza de disección de punta plana se sostuvo al poliqueto de la parte media mientras que con otra pinza se realizaron de dos a tres estimulaciones presionando cuidadosamente el abdomen y desplazando la pinza de la porción anterior hacia el pigidio. Lo anterior permitió extraer muestras de fluido celómico sin dañar al organismo. En estas muestras se obtuvieron gametos cuando los organismos estuvieron en su condición reproductiva.

El fluido celómico se recuperó con la ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó en tubos de microcentrifuga (Eppendorf). Las muestras se fijaron con formol (4% en agua de mar) y se mantuvieron en refrigeración a 10 C° para análisis posteriores.

#### **4.2.6.1 Evaluación de ovocitos**

Con la finalidad de analizar el crecimiento de los ovocitos se midieron los primeros 30 a 50 ovocitos de cada organismo utilizando un microscopio compuesto y una reglilla de calibración.

#### **4.2.6.2 Evaluación de espermias**

Se tomó una muestra de espermia recién extraído de los machos para observación en el microscopio compuesto. De manera cualitativa se evaluó motilidad de acuerdo con la siguiente escala:

- 0% de actividad: No hubo indicios de actividad.
- 50% de actividad: Aproximadamente la mitad del espermia presentó motilidad. Hubo gran cantidad de espermias en movimiento pero se observaron espermias sin movimiento. Fue posible seguir el movimiento de

los espermias a simple vista. Incluso se observaron grupos de espermia unidos.

- 100% de actividad: Mayor al 90% de espermia se observó con motilidad. Se observó una alta densidad y actividad de los espermias.

#### **4.3 Resultados adicionales**

En forma adicional al experimento de fotoperiodo se estimó el peso húmedo de dos muestras de 200 poliquetos extraídos del medio natural. La primer muestra se extrajo en el mes de marzo y la segunda en el mes de octubre. Lo anterior con la finalidad de comparar la distribución de peso y la condición de madurez de ambas muestras.

#### **4.4 Inducción al desove**

En el presente trabajo se experimentaron tres métodos de inducción al desove (Desecación, shock térmico y una combinación de amabas). Se registró peso húmedo de cada uno de los organismos inducidos al comienzo y al final de cada experimento. Los métodos utilizados se explican en detalle a continuación:

#### 4.4.1 "Desecación"

De una temperatura inicial de 18°C se sometieron 12 poliquetos maduros a dos tiempos diferentes de desecación. Se utilizaron seis poliquetos para cada tratamiento. Un tratamiento de desecación fue de 30 segundos, tiempo en el que se realizó el procedimiento de pesado individual y el otro tratamiento fue de una hora de desecación. Transcurrido el tiempo respectivo de desecación se agregó agua de mar a 18°C en los recipientes que contenían a los organismos. Para observar la respuesta de los organismos se dejaron en sus recipientes con agua de mar por 15 horas.

#### 4.4.2 "Shock térmico"

Se sometieron 12 poliquetos maduros a dos tratamientos de "Shock térmico" a 22 °C y 24 °C con seis poliquetos por tratamiento. Las temperaturas se alcanzaron colocando calentadores eléctricos en dos charolas de plástico con agua de mar. Dentro de cada charola se colocaron seis frascos con agua de mar en baño maría y se esperó a que el agua de los frascos estuviera a las temperaturas requeridas. Se tomaron los poliquetos de una temperatura original de 18 °C y se colocaron individualmente en los baños de 22 °C y 24 °C. Para observar la respuesta de los organismos se dejaron en sus recipientes con agua de mar por 15 horas.

#### 4.4.3 "Shock térmico" y "Desección"

Se sometieron seis poliquetos maduros a un tratamiento de shock térmico y desecación de la siguiente manera. Inicialmente se colocaron seis poliquetos en forma individual en cajas Petri secas y se sometieron durante siete min. a -20 °C en un congelador. Transcurrido el tiempo se sacaron del congelador e inmediatamente se añadió agua de mar a 18 C° en las cajas Petri. En este tratamiento solamente se observó la respuesta de los organismos por dos horas ya que después de agregar el agua algunos poliquetos desovaron.

#### 4.5 Fecundidad

Para evaluar la fecundidad se determinó el peso húmedo de cada organismo antes de inducir al desove. Después del desove se registró el peso húmedo de la hembra. Para conocer el número total de ovocitos, estos se recuperaron en frascos de 100 ml. Los frascos se aforaron a 100 ml. y se tomaron cuatro muestras de ovocitos de 1 ml. para realizar conteos. Con estos datos se relacionó peso húmedo individual con el número de ovocitos para estimar la fecundidad individual.

## **4.6 Estimación de la maduración**

Se realizaron dos métodos de tinción de cromosomas con la finalidad de describir la fase de meiosis en la que se encontraban los ovocitos en distintos tamaños de desarrollo. Los métodos utilizados fueron los siguientes:

### **4.6.1 Tinción de cromosomas con bisbenzimida**

La tinción se realizó de acuerdo con Harris et al. (2002). Una solución de bisbenzimida se preparó previamente con 25 $\mu$ g/ml en agua de mar con solución amortiguadora (1mM TAPS, pH 8). Inicialmente se realizaron tres lavados en agua de mar para eliminar el exceso del fijador a ovocitos fijados previamente con formaldehído al 4% en agua de mar. Se eliminó el sobrenadante de agua de mar y se tiñeron con 50  $\mu$ l de bisbenzimida. Los cromosomas se tiñeron por dos horas y con ayuda de un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro uv se tomaron imágenes fotográficas

### **4.6.2 Tinción de cromosomas con orceina**

Inicialmente se fijaron los ovocitos en una solución preparada previamente con etanol y ácido acético concentrado en una proporción 3:1 y se preparó la solución para teñir con 2 gr. de orceina en 100 ml. de ácido acético

preparado al 60% en agua destilada. Antes de realizar la tinción la solución se filtró con papel Wathman No.1 debido a que se forman cristales en la solución de orceina y pueden obstaculizar la visualización de los cromosomas. Para teñir los ovocitos se eliminó el sobrenadante de la solución fijadora y se realizó la tinción con 50  $\mu$ l de orceina. Se esperó por dos horas a que se tiñeran los cromosomas y con ayuda de un microscopio compuesto marca Zeiss se tomaron imágenes fotográficas (Stephano y Gould, 1981).

#### **4.7 Desarrollo larvario**

El desarrollo de la especie se dividió en dos etapas. En la primera, etapa correspondiente al desarrollo temprano se documentó desde la fertilización hasta la organogénesis. En la segunda etapa correspondiente al desarrollo larvario se documentaron los cambios morfológicos más sobresalientes en el desarrollo de la larva.

#### **4.8 Cultivo larvario**

Para el cultivo de la larva se utilizaron tanques cónicos de fibra de vidrio de 45 litros. La calidad del agua de cultivo se mantuvo mediante aireación constante y se utilizó agua de mar filtrada pasada por filtros de 5  $\mu$ m y 1  $\mu$ m. Finalmente el agua fue irradiada utilizando una lámpara de luz UV. Se

realizaron recambios del agua del cultivo del 75 al 100% cada tercer día. Las larvas se cultivaron a concentraciones de 1.5 a 4 larvas por ml y se alimentaron con la microalga *Isochrysis galbana* suministrada de  $7 - 10 \times 10^3$  células por ml diariamente.

#### **4.9 Inducción a la metamorfosis con KCL**

Se realizó un experimento de inducción a la metamorfosis exponiendo larvas de *Pareurythoe californica* de cinco semanas de vida a cinco diferentes concentraciones de KCL en agua de mar esterilizada. Se utilizó un control negativo en el que las larvas permanecieron en agua de mar esterilizada y se emplearon tres réplicas para cada tratamiento incluyendo el control. Se utilizaron cajas con 5 ml de medio experimental preparados con las siguientes concentraciones de KCL; 10, 20, 30, 50 y 100 mM. A partir del momento en el que se colocaron las larvas en el medio experimental se realizaron observaciones con la ayuda de un microscopio estereoscópico cada media hora durante las primeras cinco horas y después cada 24 horas durante 72 horas los primeros tres días.

#### 4.10 Análisis estadístico

Para observar si existieron diferencias en la frecuencia del diámetro promedio de los ovocitos de los poliquetos durante el experimento de fotoperiodo se realizó un análisis estadístico ANOVA ( $P < 0.05$ ) de tres factores involucrando; fotoperiodo, talla de organismo y tiempo de experimentación. Para comparar estas diferencias se realizó una prueba a posteriori por Tukey ( $P < 0.05$ ) (Zar, 1984).

Para observar si existieron diferencias en la frecuencia del diámetro de los ovocitos de los poliquetos durante el experimento de fotoperiodo, se realizó un análisis Log-Lineal ( $P < 0.05$ ) por tablas de contingencia para ver el efecto de los factores involucrados en el experimento (fotoperiodo, diámetro de ovocito, tiempo de experimentación y peso de organismo) con sus posibles interacciones (Zar, 1999). Por otro lado se realizaron pruebas de correlación para analizar los resultados de crecimiento del experimento de fotoperiodo y para ver la correlación entre el peso de los organismos y la fecundidad.

Finalmente para comparar el peso de los individuos en dos poblaciones extraídas del medio natural durante dos diferentes épocas del año. Se realizó un análisis Log-lineal ( $P < 0.05$ ) por tablas de contingencia involucrando los

factores tiempo y talla de organismo y se realizó una prueba de independencia entre ambas distribuciones ( $P < 0.0001$ ) (Sokal y Rohlf, 1981).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efecto del fotoperiodo en la maduración

#### 5.1.1 Diámetro promedio de ovocito

La media poblacional del diámetro de los ovocitos evaluada del medio natural en octubre fue de  $88\mu\text{m}$  con valores individuales máximos de  $90\mu\text{m}$  y mínimos de  $84\mu\text{m}$ . Estos valores no tuvieron diferencias en ninguna de las tres tallas en que se agruparon los organismos (Fig. 3A).

Después de dos meses de experimentación en el tratamiento de fotoperiodo de total oscuridad la media poblacional fue de  $83\mu\text{m}$  con valores promedio máximos de  $90\mu\text{m}$  y mínimos de  $74\mu\text{m}$ . En el tratamiento de fotoperiodo neutral la media poblacional fue de  $85\mu\text{m}$  con valores promedio máximos por unidad experimental de  $89\mu\text{m}$  y mínimos de  $69\mu\text{m}$ . No se observaron diferencias entre tratamientos ni entre los tres intervalos de peso (Fig. 3B). En el fotoperiodo de total oscuridad el valor mínimo fue de  $65\mu\text{m}$  y en el fotoperiodo neutral el valor mínimo fue de  $32\mu\text{m}$ .

Después de cuatro meses de experimentación el tratamiento de fotoperiodo de total oscuridad tuvo una media poblacional de diámetro promedio de ovocito de  $58\mu\text{m}$  con valores promedio máximos por unidad experimental de  $87\mu\text{m}$  y mínimos de  $38\mu\text{m}$ . El tratamiento de fotoperiodo neutral tuvo una media poblacional de diámetro promedio de ovocito de  $68\mu\text{m}$  con valores promedio máximos por unidad experimental de  $86\mu\text{m}$  y mínimos de  $45\mu\text{m}$ . Después de este periodo se observaron diferencias entre ambos tratamientos siendo el fotoperiodo neutral el que presentó los mayores diámetros promedio de ovocito en las tres tallas en que se agruparon los organismos (Fig. 3C).

Se realizó un análisis estadístico por ANOVA ( $P < 0.05$ ) de tres factores (fotoperiodo, peso de organismo y tiempo de experimentación) para ver diferencias en el diámetro promedio de los ovocitos de los poliquetos durante el experimento. Los resultados revelaron que hubo un efecto significativo del fotoperiodo. Hubo un efecto significativo en las tallas de organismo y hubo un efecto significativo en el tiempo de experimentación. La interacción fotoperiodo-talla no presentó un efecto significativo. Sin embargo las interacciones fotoperiodo-tiempo y talla-tiempo sí fueron significativas. La interacción entre los tres factores no fue significativa (Tabla II. Anexo). Se realizó una prueba a posteriori de Tukey ( $P < 0.05$ ) y se encontró una vez más un efecto significativo del fotoperiodo y el tiempo de experimentación. Hubo diferencias significativas

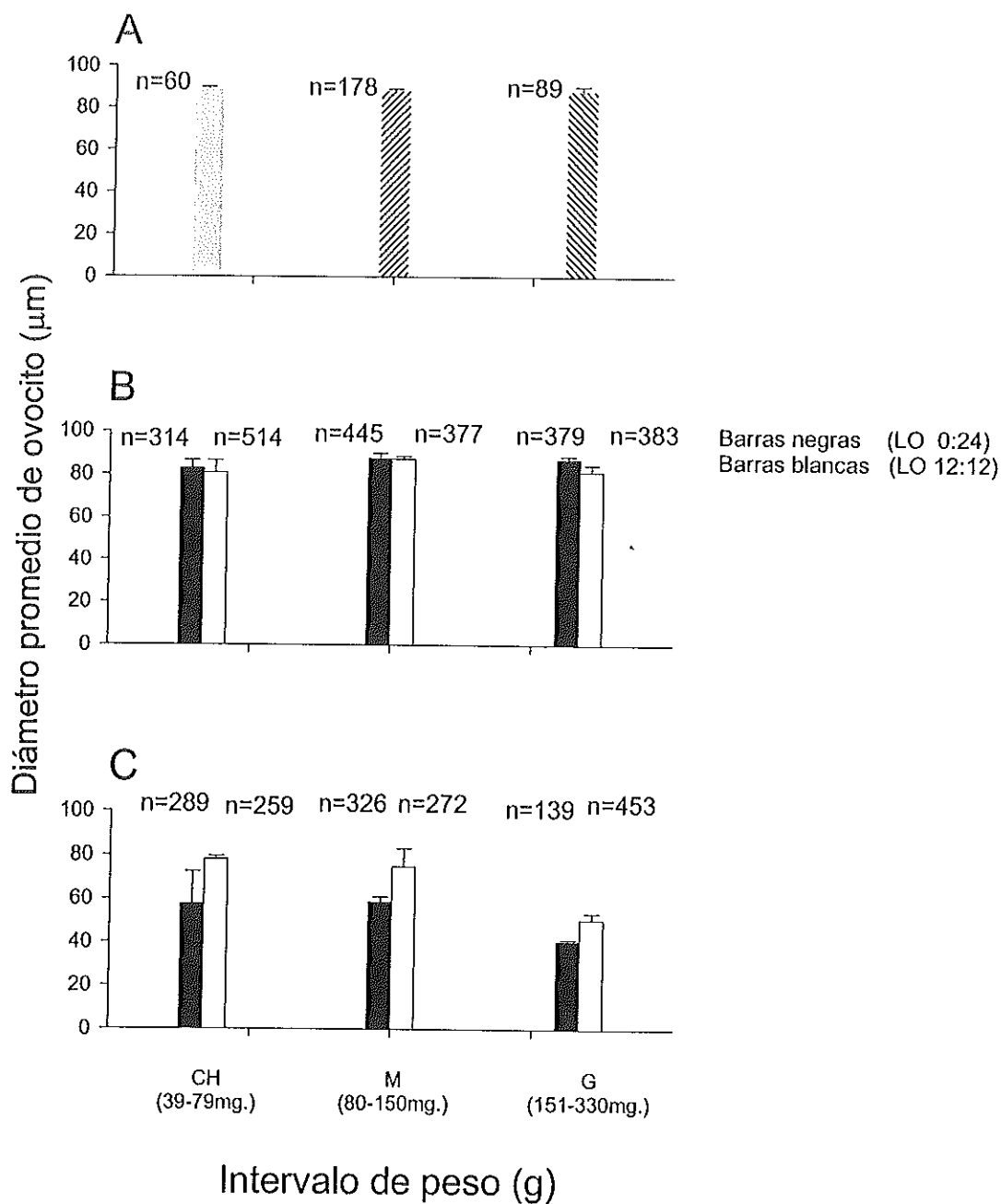


Fig.3. *Pareurythoe californica*. Diámetro promedio de ovocitos (µm) durante las tres evaluaciones realizadas en el experimento de fotoperiodo. LO (horas de Luz: horas de Oscuridad); LO 0:24 y LO 12:12. A. Evaluación Inicial (octubre 01). B. Primera evaluación (Diciembre 01). C. Segunda evaluación (Febrero 01). Las barras verticales muestran la media  $\pm$  un error std. n= número de ovocitos. Los intervalos de peso en que se agruparon los organismos fueron: CH (39-79mg.); M (80-150mg.) y G (151-330mg.).

en los diámetros de los ovocitos entre la talla grande y las otras dos tallas. Pero no hubo diferencias significativas entre la talla mediana y la chica (Tabla III, Anexo).

### 5.1.2 Distribución del diámetro de ovocito por individuo

Después de dos meses de experimentación los organismos del fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 100% de los individuos dentro del intervalo de diámetro promedio de ovocito entre 61 y 100 $\mu\text{m}$ . Los organismos del fotoperiodo neutral tuvieron el 90% de los individuos dentro del mismo intervalo. El 10% restante de los individuos de este tratamiento estuvieron entre 31 y 50 $\mu\text{m}$ . Ambos tratamientos de fotoperiodo tuvieron la mayor frecuencia de individuos en el intervalo de diámetro promedio de ovocito entre 81 y 90 $\mu\text{m}$  con el 60% aproximadamente (Fig. 4A).

Después de cuatro meses de experimentación en el fotoperiodo neutral se encontró el mayor porcentaje de individuos con el 26% dentro del intervalo de diámetro promedio de ovocito entre 71 y 80 $\mu\text{m}$ . Únicamente en este tratamiento de fotoperiodo se presentaron individuos en la categoría de 91 a 100 $\mu\text{m}$  con el 7% de los individuos. En esta evaluación se encontraron individuos con diámetros promedio de ovocito pequeños, en el intervalo entre 11 y 60 $\mu\text{m}$ . Entre 31 y 50 $\mu\text{m}$  ambos tratamientos tuvieron el 33% de los indivi-

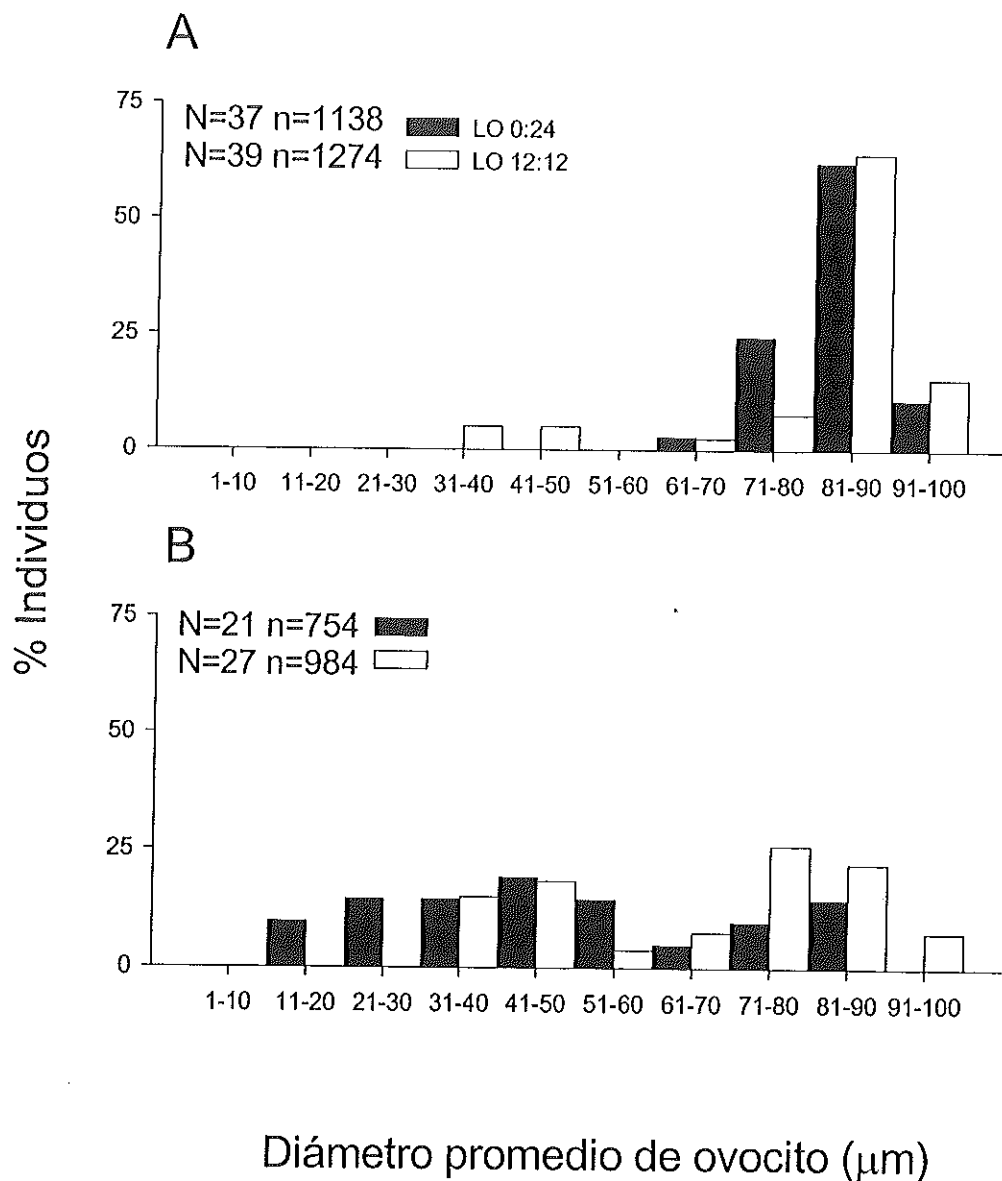


Fig.4. *Pareurythoe californica*. Efecto del fotoperiodo evaluado a través del crecimiento de los ovocitos. La gráfica muestra la frecuencia de individuos en categorías de  $9\mu\text{m}$  de diámetro medio de ovocito, basado en la medición de 30 a 50 ovocitos por individuo. Los dos tratamientos de fotoperiodo fueron: LO 0:24 y LO 12:12. A. Primera evaluación ( diciembre 01). B. Segunda evaluación (febrero 01). N= número de organismos. n= número de ovocitos.

duos, pero en el intervalo entre 11 y 30 $\mu$ m solamente hubo individuos del fotoperiodo de total oscuridad (Fig. 4B).

Para verificar el efecto de las variables (fotoperiodo, tamaño de ovocito y tiempo de experimentación con sus interacciones) en la distribución de los individuos, se realizó un análisis Log-lineal ( $P < 0.05$ ) mediante una tabla de contingencia. En este análisis los resultados no revelaron un efecto significativo del fotoperiodo pero si hubo efecto significativo en el tamaño de ovocito y en el tiempo de experimentación. La interacción tamaño de ovocito-tiempo fue significativa. Sin embargo el fotoperiodo no tuvo interacción significativa con los otros dos factores (Tabla IV. Anexo).

### 5.1.3 Frecuencia del diámetro de los ovocitos

La población de organismos extraídos del medio natural tuvo el 100% de sus ovocitos en las categorías de 80 a 100 $\mu$ m. La máxima frecuencia de diámetro de ovocito estuvo en la categoría de 90 $\mu$ m y fue del 80% (Fig. 5A).

Después de dos meses de exposición a ambas condiciones de fotoperiodo los organismos tuvieron alrededor del 60% de los ovocitos en la categoría de 90 $\mu$ m. Los organismos expuestos al fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 100% de sus ovocitos entre 70 y 100 $\mu$ m y los organis-

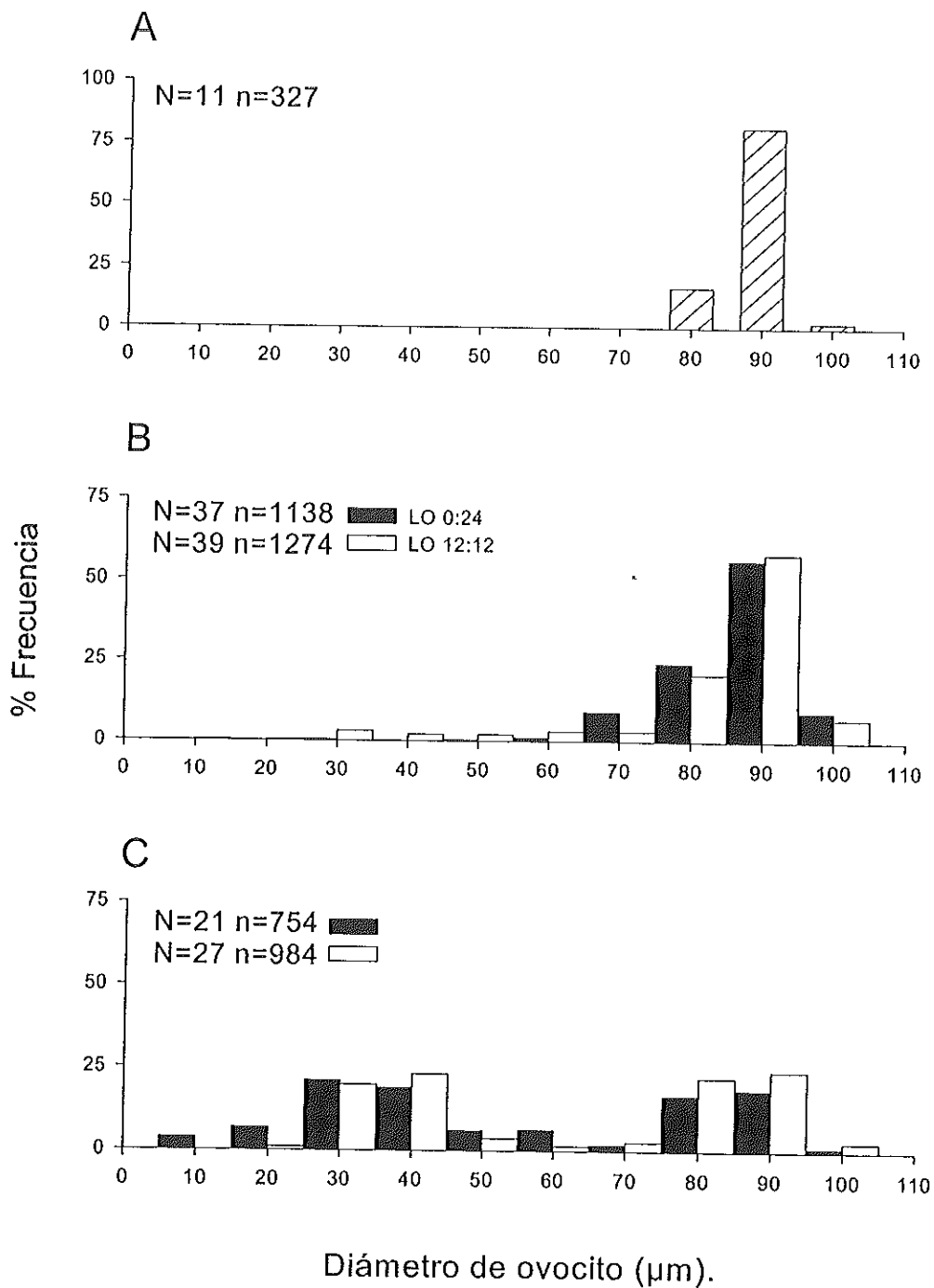


Fig.5. *Pareurythoe californica*. Efecto poblacional del experimento de fotoperiodo en la frecuencia del diámetro de ovocito para los tratamientos de fotoperiodo LO 0:24 y LO 12:12. En categorías de  $10\mu\text{m}$ . A. Evaluación inicial (octubre 01). B. Primera evaluación (diciembre 01). C. Segunda evaluación (febrero 01). N= número de organismos. n= número de ovocitos.

mos del fotoperiodo neutral tuvieron el 90% de sus ovocitos en el mismo intervalo. Los organismos del fotoperiodo neutral tuvieron el 10% de sus ovocitos en las categorías de diámetros de ovocito entre 10 y 60 $\mu$ m (Fig. 5B).

Después de cuatro meses de experimentación los organismos de ambos tratamientos de fotoperiodo tuvieron una distribución bimodal en la frecuencia de los ovocitos. Los máximos valores se presentaron en los diámetros de ovocito de 30 y 40 $\mu$ m y de 80 y 90 $\mu$ m. Los organismos expuestos al fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 40% de los ovocitos en los diámetros de 30 y 40 $\mu$ m y el 35% de los ovocitos en los diámetros de 80 y 90 $\mu$ m. El 25% de los ovocitos restantes se encontraron en seis categorías de diámetro de ovocito. Los organismos expuestos al fotoperiodo neutral tuvieron el 43% de los ovocitos en los diámetros de 30 y 40 $\mu$ m y el 46% de los ovocitos en las categorías de 80 y 90 $\mu$ m. El 11% de los ovocitos restantes se encontraron distribuidos en cinco categorías de diámetro de ovocito (Fig. 5C).

Se realizó un análisis Log-lineal ( $P < 0.05$ ) mediante una tabla de contingencia para observar el efecto de las variables (fotoperiodo, tiempo de experimentación y tamaño de ovocito con sus interacciones) en la distribución de los ovocitos. Los resultados fueron los siguientes. Hubo efecto significativo del fotoperiodo, del tiempo de experimentación y en el tamaño de ovocito.

Todas las interacciones entre los factores involucrados tuvieron un efecto significativo (Tabla V. Anexo).

#### **5.1.4 Frecuencia del diámetro de los ovocitos por intervalo de peso**

Los tres intervalos de peso húmedo en que se agruparon los poliquetos al inicio del experimento tuvieron el 100% de los ovocitos entre los 80 y 100 $\mu$ m. En las tres tallas la categoría de 90 $\mu$ m tuvo los máximos valores de frecuencia de ovocito con porcentajes arriba del 70%. Cabe señalar que en los intervalos de mayor peso se presentaron más hembras maduras. En la talla mediana (80-150mg.) y en la grande (151-330mg.) se encontraron cinco y cuatro hembras maduras respectivamente. Por el contrario en la talla chica (39-79mg.) se encontraron solamente dos hembras maduras (Fig. 6).

Después de dos meses de exposición a ambas condiciones de fotoperiodo los organismos de la talla chica correspondientes al tratamiento de total obscuridad tuvieron el 98% de los ovocitos en las categorías de 70 a 100 $\mu$ m y el 2% de los ovocitos en las categorías de 30 y 60 $\mu$ m. Los organismos expuestos a las condiciones de fotoperiodo neutral para la misma talla tuvieron el 80% de sus ovocitos en las categorías de 70 a 100 $\mu$ m y el 20% de sus ovocitos en las categorías entre 10 y 60 $\mu$ m. Los valores máximos de frecuencia de ovocito en ambas condiciones de fotoperiodo estuvieron en la categoría de

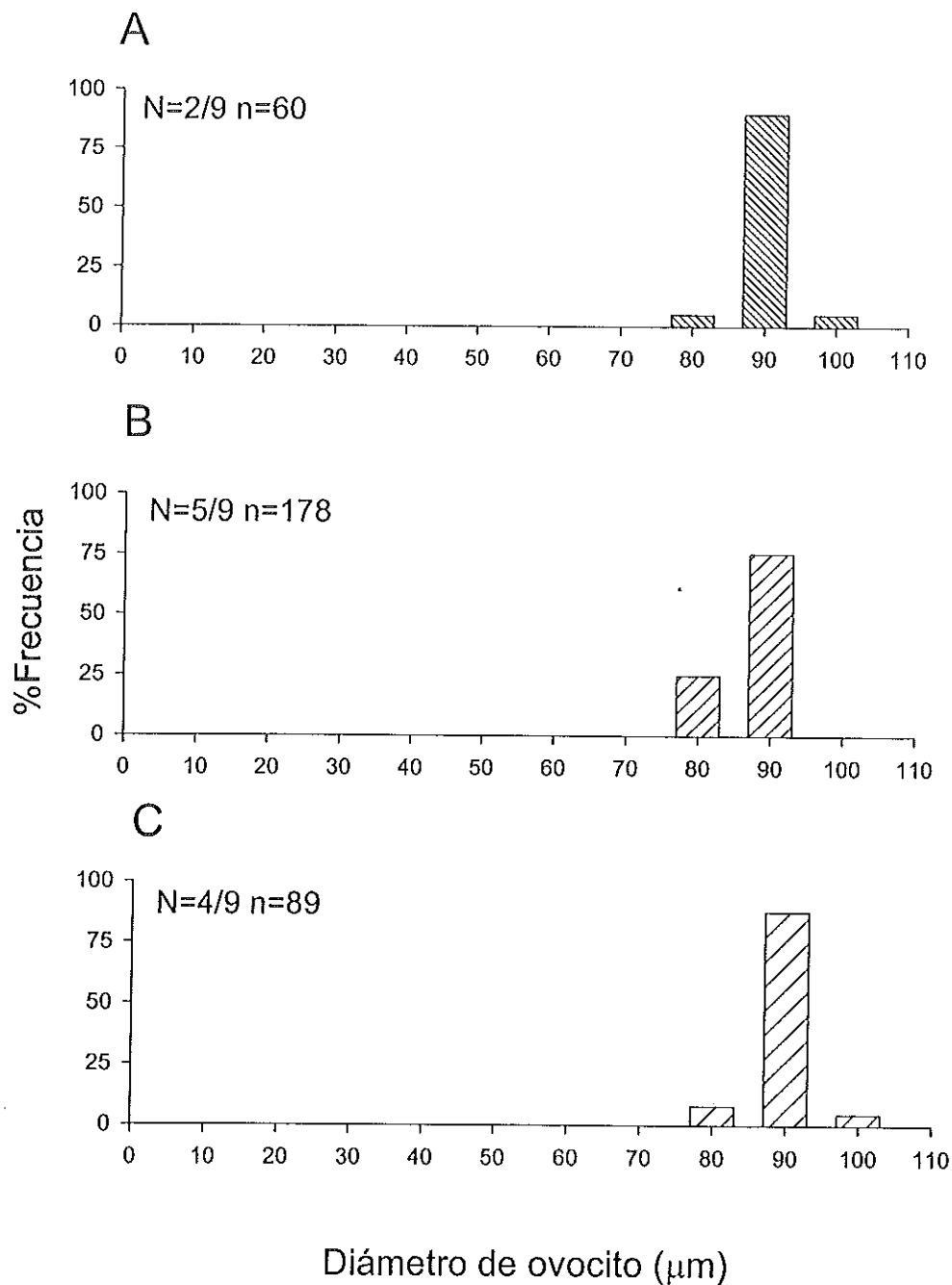


Fig.6. *Pareurythoe californica*. Frecuencia de diámetro de ovocito al inicio del experimento de fotoperiodo (octubre 01) para los tres intervalos de peso en que se agruparon los organismos. A. (39-79mg.) B. (80-150mg.) C. (151-330mg.) N= número de organismos con presencia de ovocitos de nueve poliquetos analizados por intervalo de peso. n= número de ovocitos.

90 $\mu\text{m}$  con el 43% de los ovocitos en este diámetro (Fig. 7A).

En la misma evaluación los organismos de la talla mediana de ambas condiciones de fotoperiodo presentaron en promedio el 98% de los ovocitos entre 70 y 100 $\mu\text{m}$ . Ambos tratamientos de fotoperiodo tuvieron los valores máximos de frecuencia de ovocito en la categoría de 90 $\mu\text{m}$  con aproximadamente el 65% de los ovocitos (Fig. 7B).

En este periodo de experimentación los organismos de la talla grande correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 100% de los ovocitos entre 70 y 100 $\mu\text{m}$ . Los organismos expuestos a las condiciones de fotoperiodo neutral para la misma talla tuvieron el 90% de los ovocitos entre 70 y 100 $\mu\text{m}$  y el 10% de los ovocitos entre 30 y 50 $\mu\text{m}$ . Este tratamiento de fotoperiodo fue el que presentó el máximo valor de frecuencia de ovocitos con el 73% en la categoría de los 90 $\mu\text{m}$  (Fig. 7C).

Después de cuatro meses de exposición a ambas condiciones de fotoperiodo los organismos de la talla chica correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 50% de los ovocitos entre 70 y 90 $\mu\text{m}$  y el 50% de

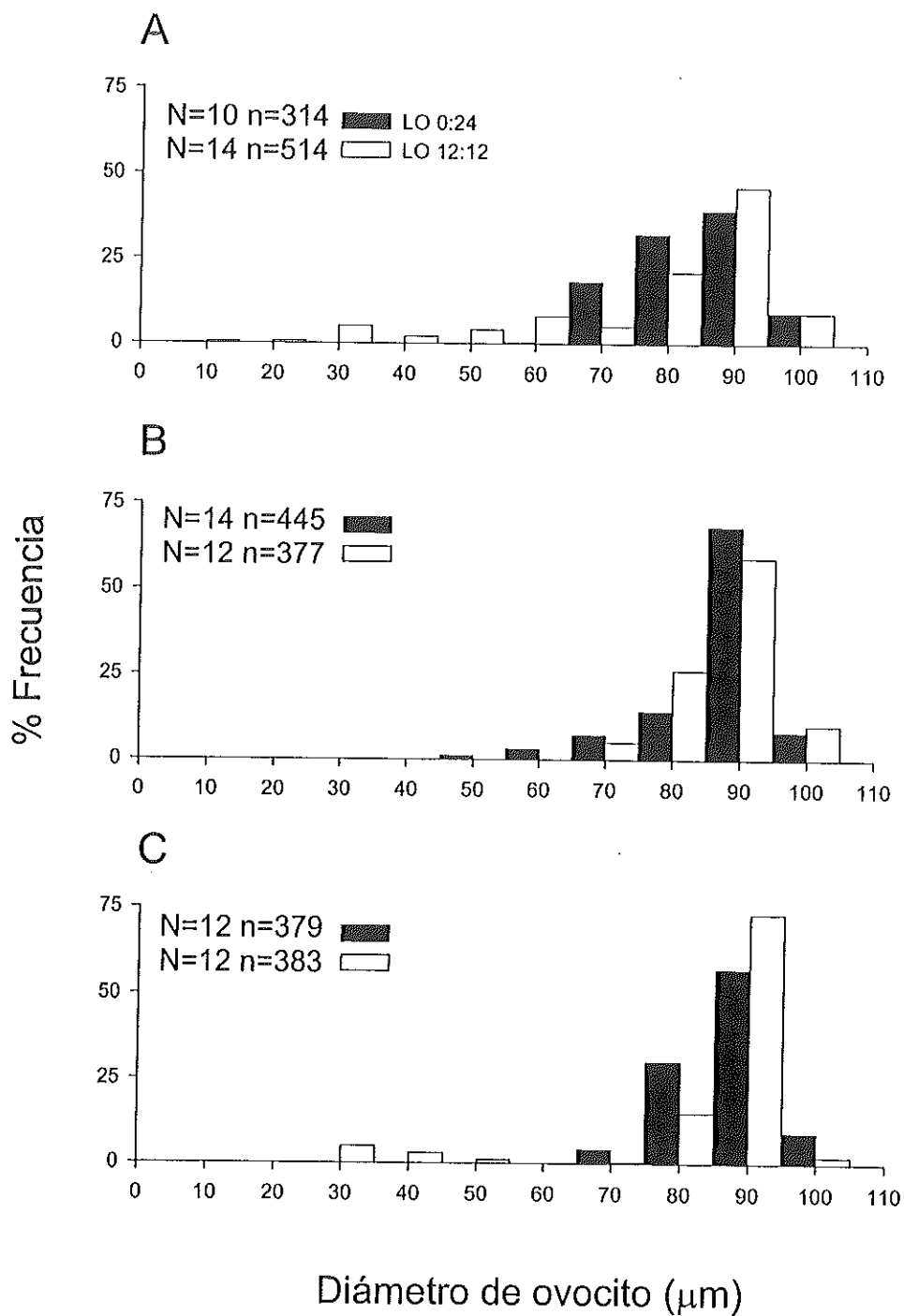


Fig.7. *Pareurythoe californica*. Efecto del fotoperiodo en el diámetro de los ovocitos después de dos meses de exposición (diciembre 01) a los tratamientos de fotoperiodo LO 0:24 y LO 12:12. Para los tres intervalos de peso en que se agruparon los organismos al comienzo del experimento. A. (39 -79mg.) B. (80-150mg.) C. (151-330mg.) N= número de organismos. n=número de ovocitos.

los ovocitos entre 10 y 60 $\mu$ m. El valor máximo de frecuencia de ovocito para este tratamiento de fotoperiodo estuvo en la categoría de 90 $\mu$ m con el 32% de los ovocitos. Los organismos expuestos al fotoperiodo neutral para la misma talla de organismos tuvieron el 84% de los ovocitos entre 70 y 90 $\mu$ m y el 16% de los ovocitos entre 30 y 60 $\mu$ m. El valor máximo de frecuencia de ovocito para este tratamiento de fotoperiodo estuvo en la categoría de 80 y 90 $\mu$ m que sumaron el 40% de los ovocitos considerando ambas categorías (Fig. 8A).

En la misma evaluación los organismos de la talla mediana correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 40% de los ovocitos entre 70 y 100 $\mu$ m y el 60% de los ovocitos entre 20 y 60 $\mu$ m. Los organismos expuestos al fotoperiodo neutral para la misma talla de organismos tuvieron el 60% de los ovocitos entre 80 y 100 $\mu$ m y el 40% de los ovocitos entre 30 y 60 $\mu$ m (Fig. 8B).

En el mismo periodo de tiempo los organismos de la talla grande correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad tuvieron el 13% de los ovocitos entre 70 y 80 $\mu$ m y el 87% de los ovocitos entre 20 y 60 $\mu$ m. Los organismos expuestos al fotoperiodo neutral para la misma talla de organismos tuvieron el 30% de los ovocitos entre 70 y 90 $\mu$ m y el 70% de los ovocitos entre 30 y 50 $\mu$ m. El valor máximo de frecuencia de ovocitos en ambos tratamientos

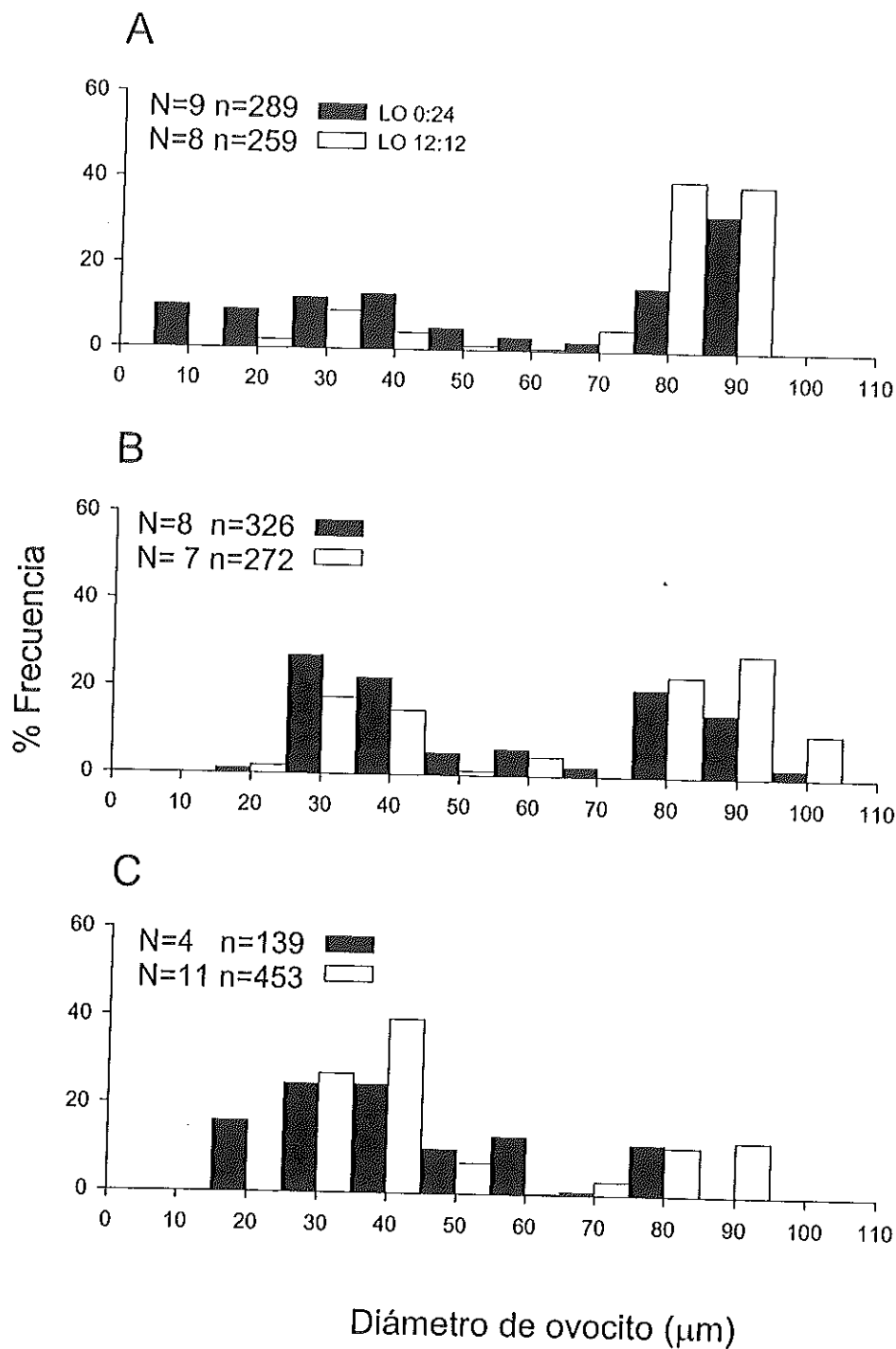


Fig.8. *Pareurythoe californica*. Efecto del fotoperiodo en el diámetro de los ovocitos después de cuatro meses (febrero 01) de exposición a los tratamientos de fotoperiodo LO 0:24 y LO 12:12 para los tres intervalos de peso en que se agruparon los organismos al comienzo del experimento. A. (39-79mg.) B. (80-150mg.) C. (151-330mg.) N=número de organismos. n=número de ovocitos.

de fotoperiodo se encontró en el fotoperiodo neutral con el 40% de los ovocitos en la categoría de  $40\mu\text{m}$  (Fig. 8C).

Para evaluar el efecto de las variables (fotoperiodo, tiempo de experimentación, intervalo de peso y tamaño de ovocito con sus interacciones) en el diámetro de los ovocitos por intervalo de peso, se realizó un análisis Log-lineal ( $P < 0.05$ ) mediante una tabla de contingencia. Los resultados reflejaron que hubo un efecto significativo del fotoperiodo, del tiempo de experimentación, de las tallas de organismo y en el tamaño de ovocito. Todas las interacciones entre las variables también fueron significativas (Tabla VI. Anexo).

#### **5.1.5 Motilidad espermática**

En la evaluación inicial de los tres intervalos de peso se encontraron tres machos con el 100% de motilidad espermática por talla (Fig. 9A). Después de dos meses de experimentación en el tratamiento de fotoperiodo neutral se encontraron 37 machos con presencia de esperma de los cuales el 70% tenía esperma con 100% de motilidad. En el tratamiento de fotoperiodo de total obscuridad se encontraron 31 poliquetos con presencia de esperma de los cuales el 65% tenían esperma con 100% de motilidad. En esta evaluación no se observaron diferencias entre tratamientos en el porcentaje de machos con 100% de motilidad espermática (Fig. 9B).

Después de cuatro meses de experimentación disminuyó drásticamente el número de machos con presencia de esperma en ambas condiciones de fotoperiodo. En el fotoperiodo de oscuridad se encontraron seis machos con esperma con el 100% de motilidad y en el fotoperiodo neutral se encontraron dos machos con esperma con 100% de motilidad (Fig. 9C).

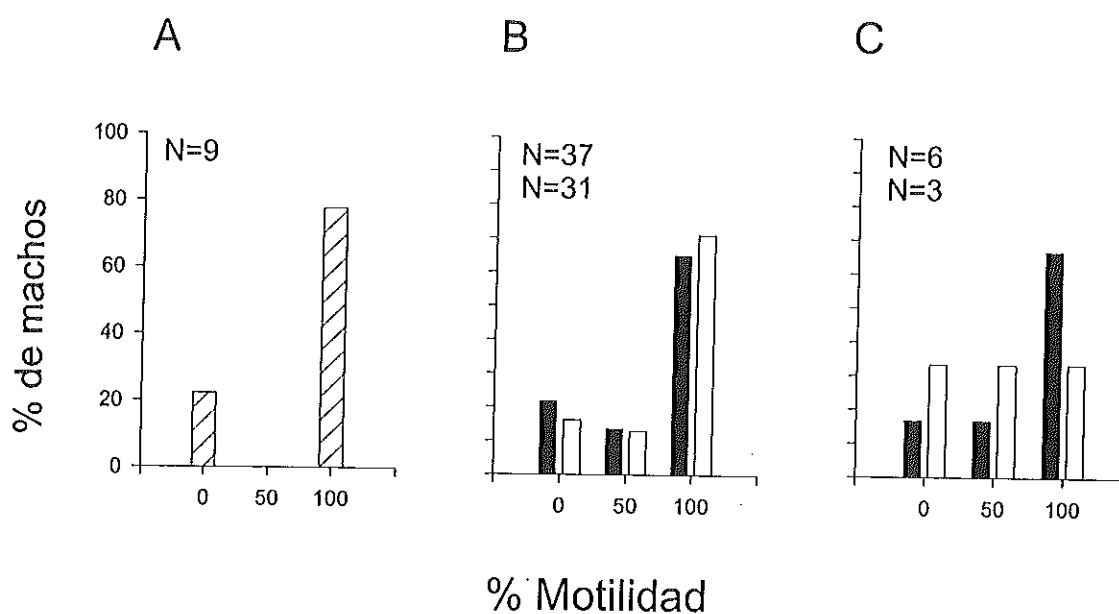


Fig.9. *Pareurythoe californica*. Motilidad espermática. A. Evaluación inicial. B. Primera evaluación. C. Segunda evaluación. Barras negras; LO 0:24. Barras blancas; LO 12:12. Las categorías de motilidad fueron: 0% de motilidad; No hubo indicios de actividad. 50% de motilidad; Cuando hubo espermas en movimiento y espermas sin movimiento. 100% de motilidad; Cuando más del 90% de los espermas se observaron en movimiento. N= número de organismos evaluados.

## 5.2 Efecto del fotoperiodo en el crecimiento

En todas las evaluaciones se observó un mayor incremento en peso en las condiciones del fotoperiodo de total oscuridad que en las condiciones de fotoperiodo neutral. Las tres tallas en que se agruparon los organismos presentaron la misma tendencia (Fig. 10). Los organismos sometidos al fotoperiodo de total oscuridad aumentaron 210mg en promedio y los organismos expuestos a las condiciones de fotoperiodo neutral aumentaron 140mg en promedio.

Considerando los resultados por intervalo de peso se obtuvo que los organismos de la talla chica correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad aumentaron por bimestre un promedio de 210mg obteniéndose una correlación altamente significativa respecto al tiempo ( $r = 0.97$   $P < 0.05$ ) y los organismos expuestos a las condiciones de fotoperiodo neutral aumentaron 90mg en promedio obteniéndose una correlación altamente significativa ( $r = 0.95$   $P < 0.05$ ). Los organismos de la talla mediana correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad aumentaron en promedio 190mg por bimestre obteniéndose también una correlación altamente significativa ( $r = 0.98$   $P < 0.05$ ) y los organismos expuestos a las condiciones de fotoperiodo neutral aumentaron en promedio 140mg por bimestre obteniéndose también una buena correlación ( $r = 0.99$

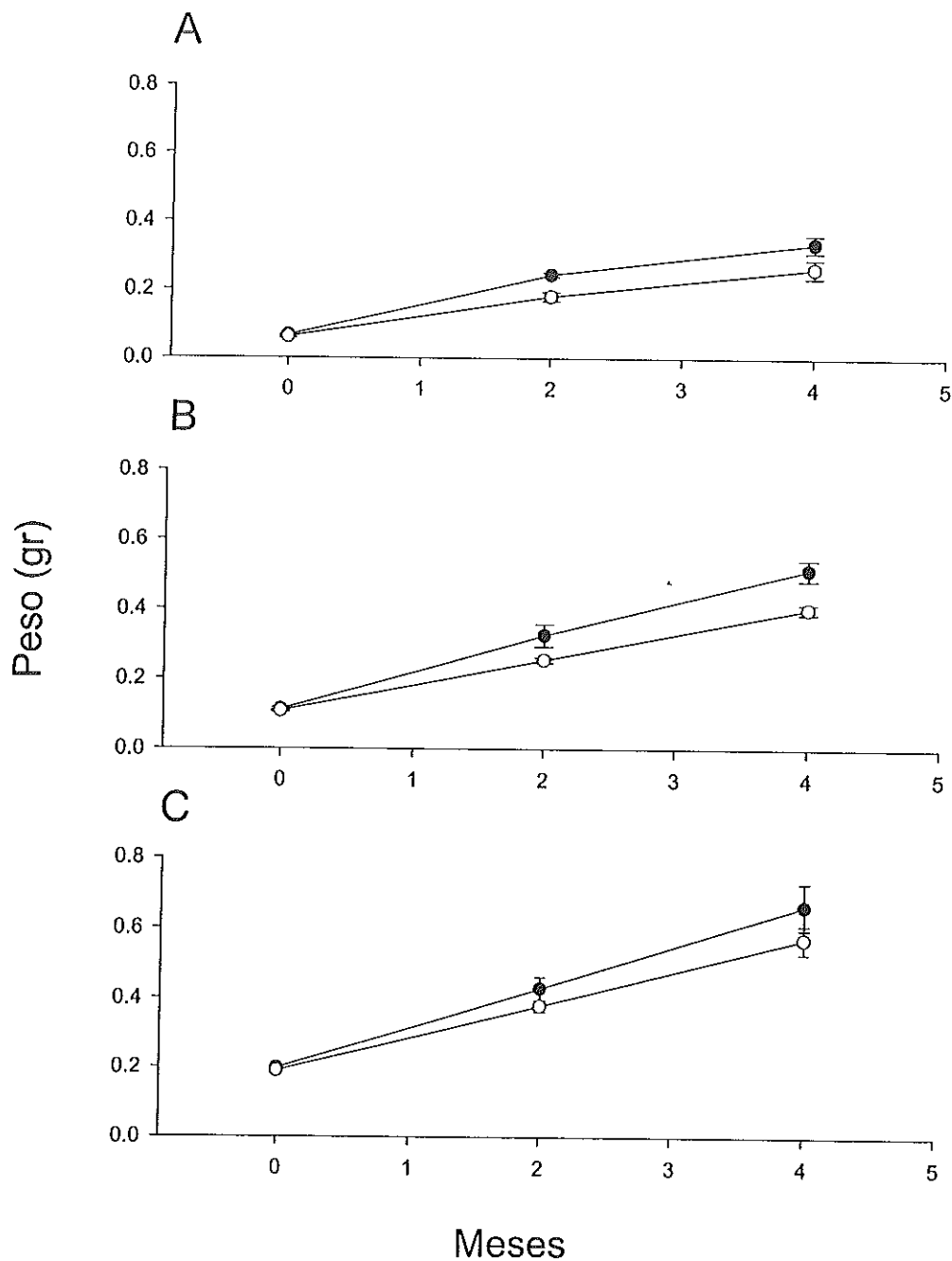


Fig.10. *Pareurythoe californica*. Incremento en peso de los poliquetos en las tres evaluaciones realizadas durante el experimento de fotoperiodo, para los tratamientos: LO 0:24; círculos negros y LO 12:12; círculos blancos y para los tres intervalos de peso húmedo. A. (39 - 79mg.) B. (80-150mg.) C. (151-330mg.). Cada punto de la gráfica representa la media  $\pm$  un error std. del peso promedio de los organismos por intervalo de peso húmedo.

$P < 0.05$ ). Los organismos de la talla grande correspondientes al fotoperiodo de total oscuridad aumentaron en promedio 230mg por bimestre obteniéndose una correlación alta ( $r = 0.95$   $P < 0.05$ ) y los organismos expuestos a las condiciones de fotoperiodo neutral aumentaron en promedio 190mg por bimestre obteniéndose también una correlación alta ( $r = 0.97$   $P < 0.05$ ).

### 5.3 Proporción de sexos durante el experimento

En este trabajo se observó que esta especie de poliqueto no presenta dimorfismo sexual. Los organismos se observan de color rosado claro en su condición inmadura. Sin embargo en su condición madura se pueden sexar a simple vista debido a que a través de sus segmentos abdominales se observa el color de los gametos, los cuales se desarrollan a lo largo de la cavidad celómica. Las hembras presentan de un color rosado oscuro por sus abundantes ovocitos y los machos un color rosado claro debido a que en los segmentos abdominales se encuentra el esperma (Fig.11).

La proporción de sexos al inicio del experimento evaluada del medio natural fue de 0.75 machos/hembra. De 27 poliquetos analizados el 40% fueron hembras y el 30% fueron machos. El 30% fueron poliquetos con ausencia de gametos y por lo tanto indiferenciados sexualmente (Fig. 12A).

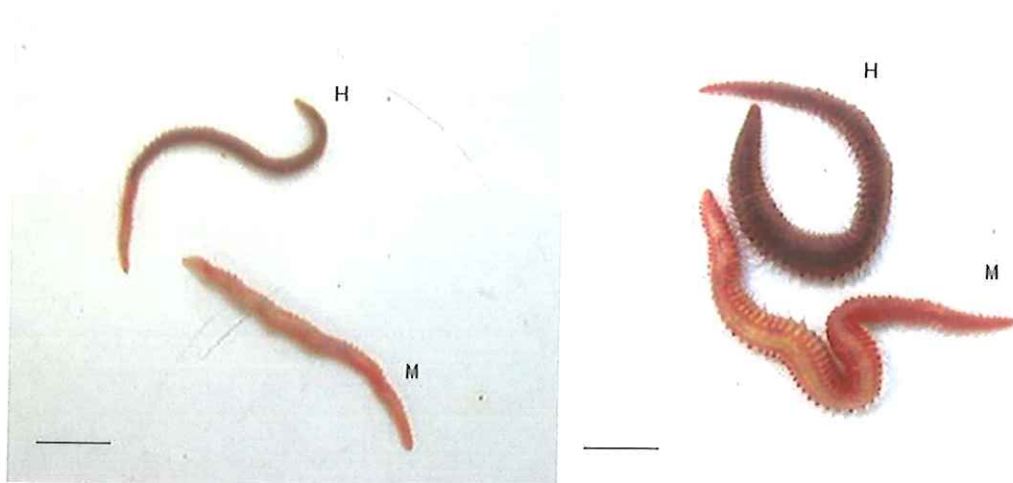


Fig.11. *Pareurythoe californica*. Adultos maduros de ambos sexos colectados en el medio natural (Izquierda) y organismos mantenidos en laboratorio por cuatro meses (Derecha). H; hembras. M; machos. Barra = 2 cm

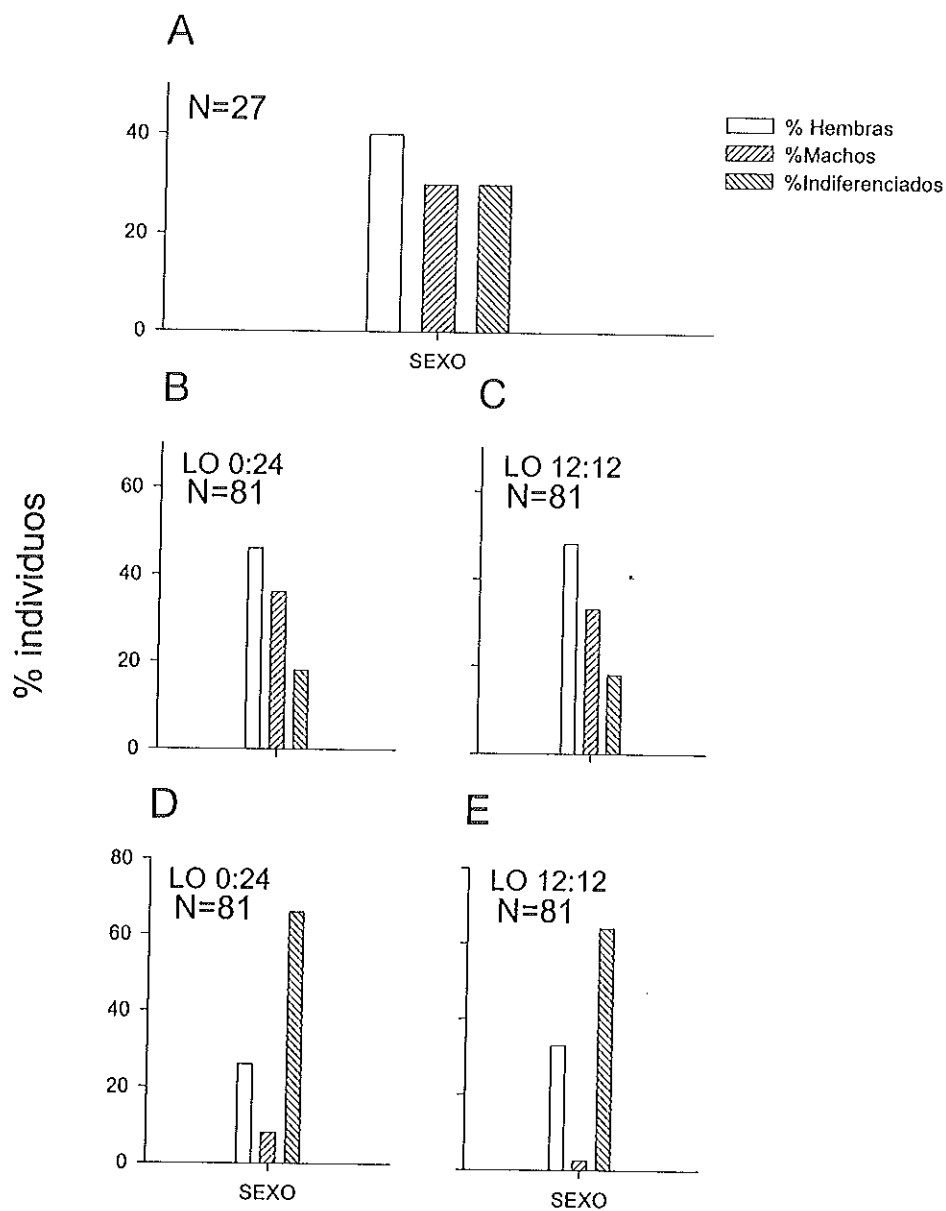


Fig.12. *Pareurythoe californica*. Proporción de sexos durante el experimento de fotoperiodo. A. Evaluación Inicial (octubre); organismos evaluados del medio natural. B y C Primera evaluación (diciembre). Proporción de sexos después de dos meses de experimentación. C. y D. Segunda evaluación (febrero). Proporción de sexos después de cuatro meses de experimentación. N=número de organismos examinados.

Analizando la proporción de sexos durante el experimento de fotoperiodo respecto al número de organismos con presencia de gametos y el número de organismos con ausencia de gametos o indiferenciados, se pudo observar que después de dos meses de experimentación la proporción fue la misma en los tratamientos. En promedio de los 81 poliquetos de cada tratamiento el 58% fueron hembras, el 41% fueron machos y el 22% fueron organismos indiferenciados. La proporción de sexos fue 0.70 machos/hembra (Fig. 12B,C). Después de cuatro meses de experimentación tampoco se observaron diferencias entre tratamientos. Sin embargo la mayoría de la población de machos con presencia de gametos disminuyó drásticamente pasando a la categoría de organismos indiferenciados. Los valores descendieron al 5% de machos con presencia de esperma en promedio por tratamiento. En las hembras sucedió lo mismo pero en menor grado. Los valores descendieron del 45% de hembras con presencia de ovocitos al 30% en promedio por tratamiento (Fig. 12D,E).

#### **5.4 Medición de variables**

La temperatura del agua de mar que abasteció a los organismos durante el experimento de fotoperiodo tuvo un decremento paulatino debido a las condiciones de otoño-invierno de la localidad (Fig. 13). En los primeros dos meses de experimentación la temperatura del agua de mar tuvo un promedio

máximo de 19°C y un mínimo de 18°C. En los siguientes dos meses de experimentación la temperatura del agua de mar tuvo un promedio máximo de 16°C y un mínimo de 15°C.

En las series de tiempo en las que se evaluó la concentración de oxígeno disuelto de las unidades experimentales durante las sesiones de alimentación, no se observaron diferencias en las concentraciones de oxígeno disuelto entre réplicas ni entre tratamientos. En ambos tratamientos se observó que de una concentración inicial de 8.5 mg/l de oxígeno disuelto las concentraciones no disminuyeron más de 1.5 mg/l después de tres horas de haber suspendido el flujo de agua para alimentar. Esto es menos del 20% de la concentración promedio de oxígeno disuelto inicial (Fig. 14).

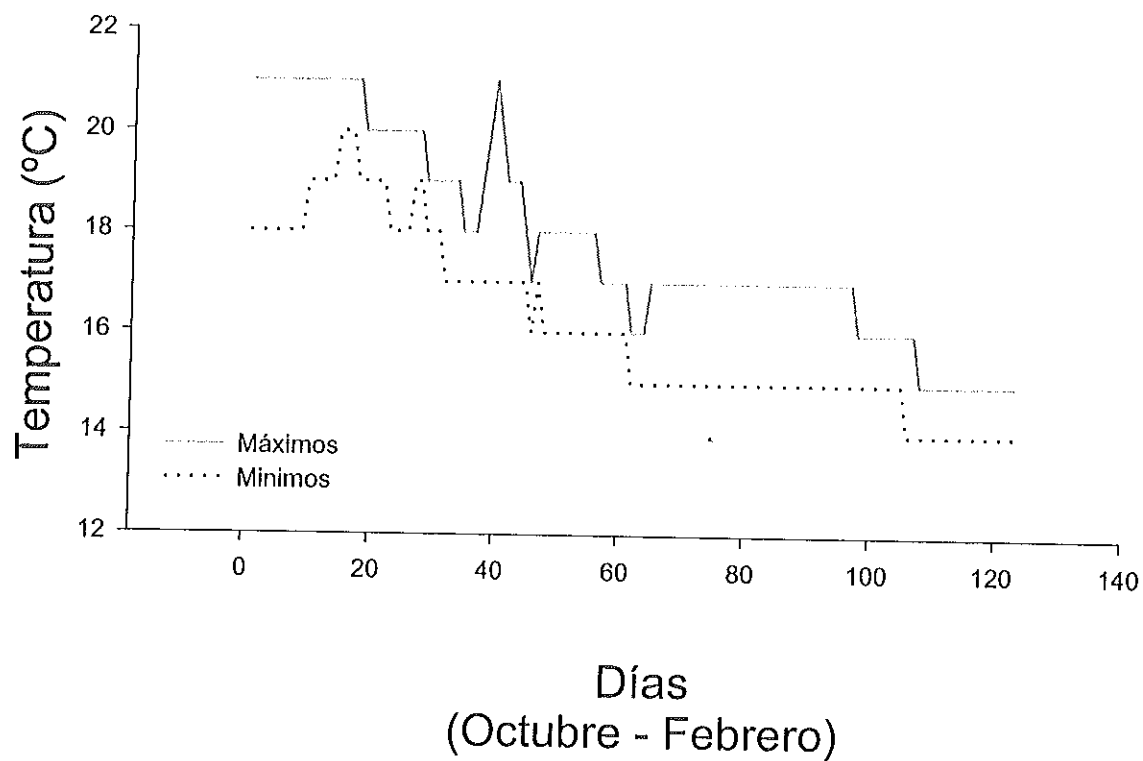


Fig.13. Máximos y mínimos de temperatura en el agua de mar de los frascos de cultivo durante el experimento de fotoperiodo.

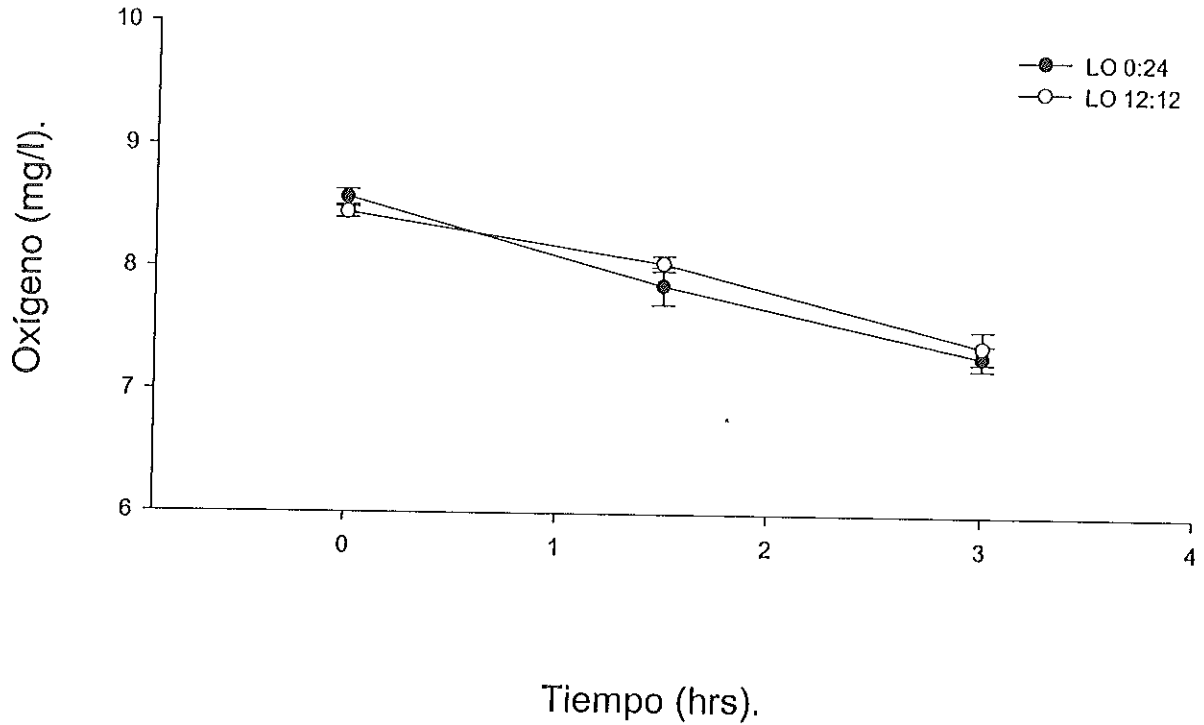


Fig.14. Concentración media de oxígeno disuelto en el agua de mar de los recipientes de cultivo durante la alimentación. Se retiró el flujo de agua y aire por un periodo de tres hrs. para facilitar la alimentación de los poliquetos. Cada punto representa la media  $\pm$  un error std. de los mg/l de oxígeno disuelto que contenían las nueve replicas utilizadas por tratamiento de fotoperiodo.

## 5.5 Resultados adicionales

Resultados adicionales al experimento de fotoperiodo se presentan a continuación y agregan información sobre condiciones reproductivas de los organismos en el medio, así como otros aspectos útiles para su manejo en el laboratorio.

### 5.5.1 Estimación de peso individual en el medio natural

Una muestra de 188 poliquetos colectados en marzo tuvo una distribución de peso unimodal. La mayor frecuencia de individuos se encontró entre 60 y 79mg correspondiente al 36% de la población. El intervalo de valores de peso húmedo de los individuos estuvo entre 19 y 190mg. En la muestra de 295 poliquetos colectados en octubre se observó una distribución de peso unimodal. El 44% de los organismos muestreados pesaron entre 100 y 290mg siendo esta la mayor frecuencia de individuos. El intervalo de peso húmedo estuvo entre 24 y 362mg (Fig. 15A).

Para verificar si existieron diferencias entre ambas distribuciones de peso se realizó un análisis Log-lineal ( $P < 0.05$ ) mediante una tabla de contingencia involucrando los factores tiempo y talla de organismo resultando

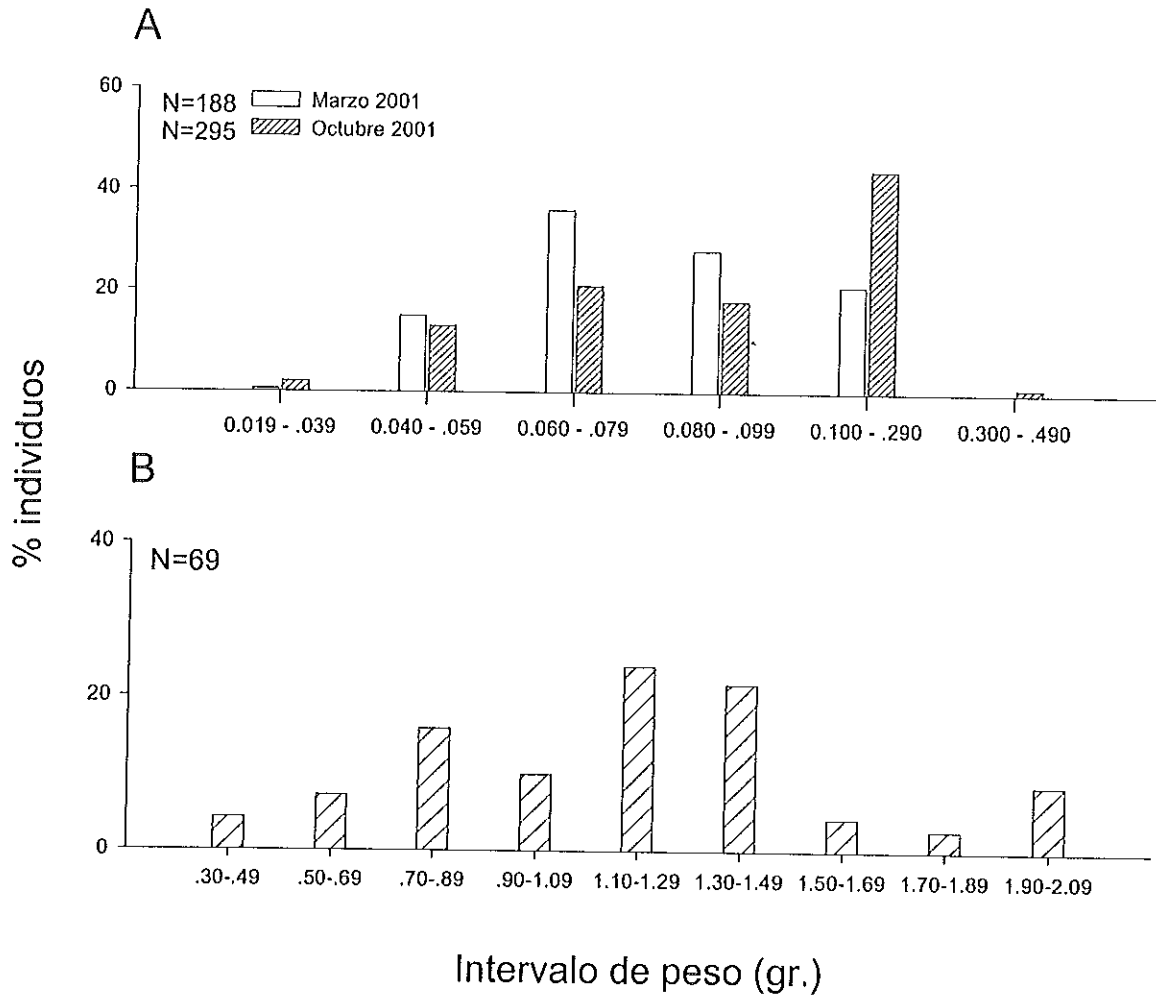


Fig.15. *Pareurythoe californica*. Peso húmedo de los poliquetos evaluado; A. del medio natural en marzo (barras blancas). B. Organismos mantenidos en laboratorio de marzo a septiembre. N= número de poliquetos pesados.

diferencias significativas entre ambas evaluaciones (En Marzo;  $P < 0.000000$  y en Octubre;  $P < 0.000002$ ) y se realizó una prueba de independencia resultando significativa ( $P < 0.0001$ ).

### **5.5.2 Peso por individuo en organismos mantenidos en el laboratorio**

En la distribución de peso húmedo obtenida de una población de 70 poliquetos mantenidos de marzo a septiembre del 2001 se observaron dos intervalos en los que se presentó el mayor incremento de peso. El 24% de los individuos estuvo entre los 1.10 y 1.29gr. y el 22% de los individuos estuvo entre los 1.30 y 1.49gr. El valor máximo de peso húmedo obtenido en este grupo de organismos fue de 2.09gr. este valor fue el máximo registrado en el presente trabajo (Fig. 15B).

### **5.5.3 Crecimiento de ovocitos en organismos mantenidos en laboratorio**

Se cuantificó el crecimiento del diámetro de los ovocitos de aproximadamente 200 poliquetos mantenidos en el laboratorio de marzo a septiembre del 2001. El proceso de ovogénesis en los poliquetos tuvo una duración de seis meses hasta alcanzar una talla máxima de ovocito de  $90\mu\text{m}$ . En marzo se encontró el 100% de la población de poliquetos con ausencia de gametos. En mayo hubo presencia de ovocitos y tuvieron un diámetro promedio

de 44 $\mu$ m. En agosto los ovocitos tuvieron un diámetro promedio de 76 $\mu$ m. Finalmente en septiembre los ovocitos tuvieron un diámetro promedio de 90 $\mu$ m (Fig. 16). En esta etapa los poliquetos empezaron a tener desoves aislados cada vez más frecuentes hasta llegar a presentarse desoves masivos a mediados de octubre.

### **5.6 Inducción al desove y fecundidad**

De los tres experimentos de inducción al desove solamente respondieron positivamente los organismos sometidos al tratamiento de "Shock térmico y desecación" (Tabla VII). Los datos obtenidos en este desove mostraron que en esta especie la fecundidad es proporcional al peso de los organismos. La correlación fue altamente significativa ( $r= 1.0$   $P<0.05$ ). Se observó que a mayor peso húmedo los organismos tuvieron una mayor fecundidad (Fig. 17). En promedio un organismo de 700mg. desovó 271,522 ovocitos.

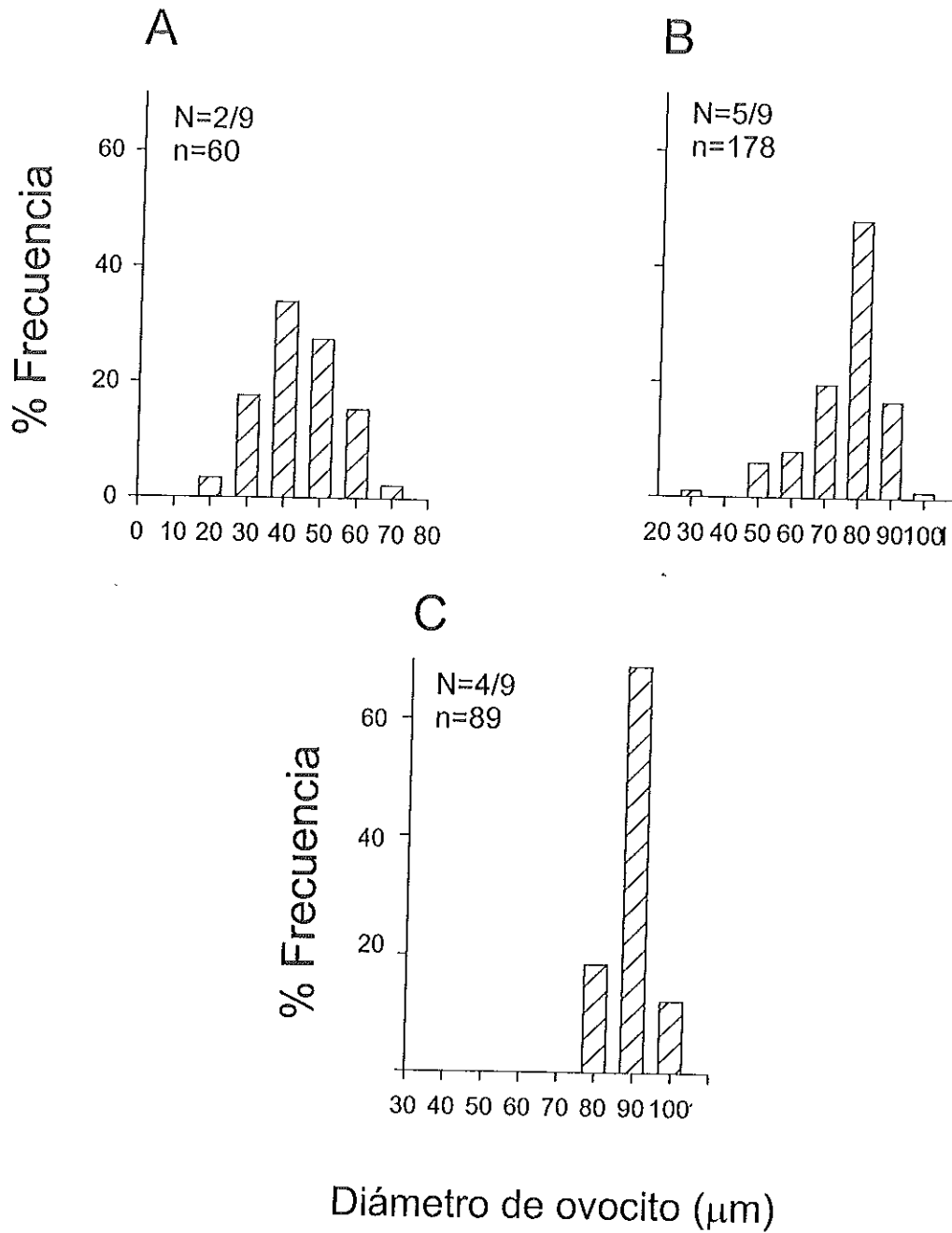


Fig.16. *Pareurythoe californica*. Crecimiento de ovocitos evaluados en el laboratorio a organismos mantenidos durante: A. mayo 2001; B. agosto 2001 y C. septiembre 2001. N= número de organismos. n=número de ovocitos.

Tabla VII. Experimentos de inducción al desove. De una temperatura original de 18°C, 30 hembras fueron inducidas al desove en condiciones de laboratorio someténdolas a diferentes condiciones de estrés. Las hembras utilizadas en estos experimentos maduraron en el laboratorio y no fueron manipuladas con anterioridad.

TRATAMIENTO PARA INDUCIR AL DESOVE	RESULTADOS
<p>1. Se transfirieron 12 poliquetos individualmente en desecación total por dos diferentes periodos de tiempo. Se utilizaron seis poliquetos en cada periodo de tiempo:</p> <p style="text-align: center;">A) 30 segundos      y      B) 1 hora.</p>	<p>No desovó ningún organismo</p>
<p>2. Se transfirieron 12 poliquetos a dos tratamientos de shock térmico en agua de mar por 30 minutos. Se utilizaron seis poliquetos para cada tratamiento: A) 22°C y B) 24°C</p> <p>-----</p>	<p>No desovó ningún organismo</p> <p>-----</p>
<p>3. Al no haber respuesta en los dos tratamientos (del experimento 2.). Se transfirieron a otro shock térmico en agua de mar a 14°C, de sus respectivas temperaturas.</p>	<p>No desovó ningún organismo</p>
<p>4. Se colocaron seis organismos individualmente en desecación y se sometieron a un shock térmico a 20°C por siete minutos. Transcurrido el tiempo se colocaron a temperatura ambiente y se les agregó agua de mar a 18°C.</p>	<p>Desovaron cuatro organismos</p>

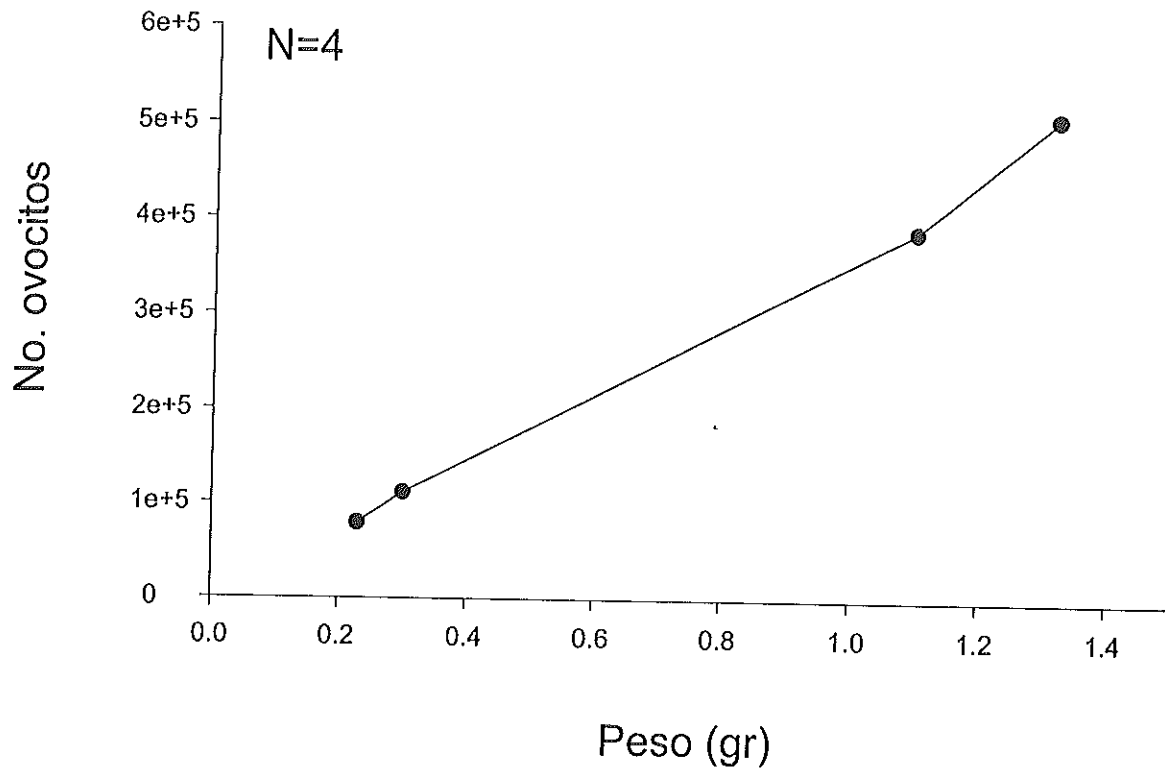


Fig.17. *Pareurythoe californica*. Fecundidad estimada en poliquetos desovados bajo las condiciones del experimento de inducción al desove: "Desección" y "Shock termico". Cada punto representa la media  $\pm$  un error std. Debido a la escala utilizada en el eje Y el error std. no es apreciable en la gráfica.

## 5.7 Tinción de cromosomas

Por medio de la tinción con bisbenzimidida, se pudieron observar teñidos los cromosomas hasta 48 horas después de haber agregado la bisbenzimidida debido a la gruesa membrana que tienen los ovocitos de esta especie. Los ovocitos se encontraban en estadio profase de meiosis en las tallas de ovocito maduro de  $90\mu\text{m}$  (Fig. 18A,B).

Por medio de la tinción con orceina, se pudieron observar los cromosomas dos horas después de haber agregado la tinción. Se observaron ovocitos de  $90\mu\text{m}$  que se encontraban en estadio profase y ovocitos de  $40$  y  $50\mu\text{m}$  que se encontraban en estadio interfase (Fig. 18C,D). Cabe mencionar que en esta ocasión se observó un ovocito atípico de  $90\mu\text{m}$  en estadio metafase de meiosis (Fig. 18E).

## 5.8. Desarrollo embrionario y larvario

### 5.8.1 Desarrollo embrionario

A 40 minutos después de la fertilización se pudo observar un cinturón tenue en todo el ecuador de los ovocitos (Fig. 19A). Esta característica se relacionó como signo de fertilización en este trabajo. La primera división celular se observó dos horas y media después de la fertilización con la formación de los primeros dos blastómeros (Fig. 19B). La aparición del lóbulo polar y el proceso en el que es absorbido por un blastómero fue tres horas después de la fertilización (Fig. 19C). La segunda división celular se pudo observar cuatro horas después de la fertilización con la formación de cuatro blastómeros (Fig. 19D). El estadio de mórula se observó 17 horas después de la fertilización (Fig. 19E).

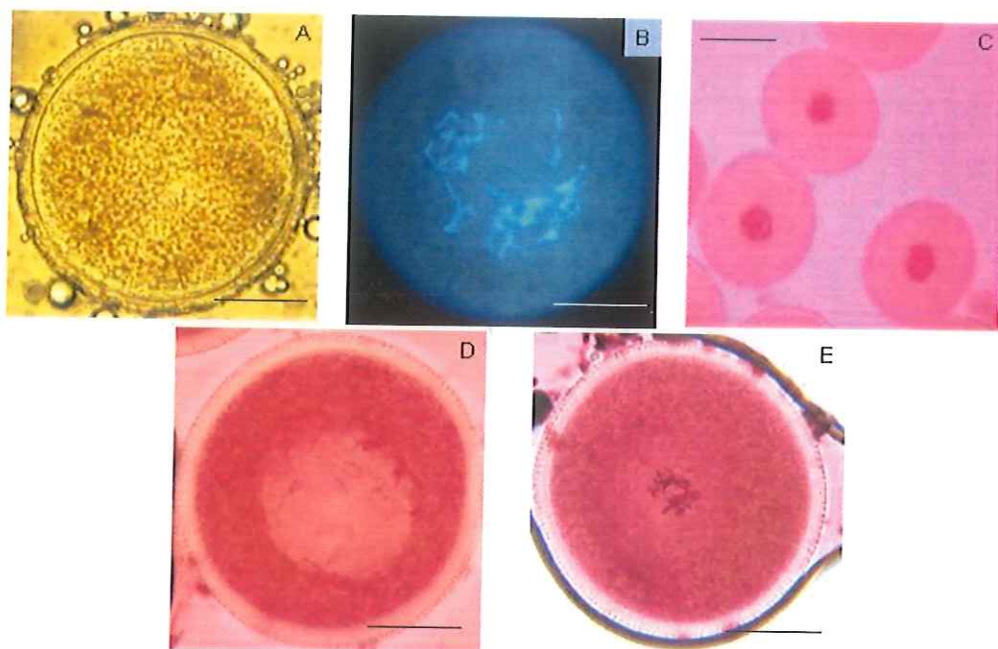


Fig.18. *Pareurythoe californica*. Tinción de cromosomas. A. Referencia; ovocito maduro de 90µm. B. Tinción con bisbenzimidazole; ovocito maduro en estadio profase de meiosis. C. Ovocitos entre 40 y 50µm en estadio interfase de meiosis, tinción con orceína (TO). D. Ovocito maduro en estadio profase de meiosis (TO). E. Ovocito atípico de 90µm en estadio metafase de meiosis (TO). Barras= 30µm.

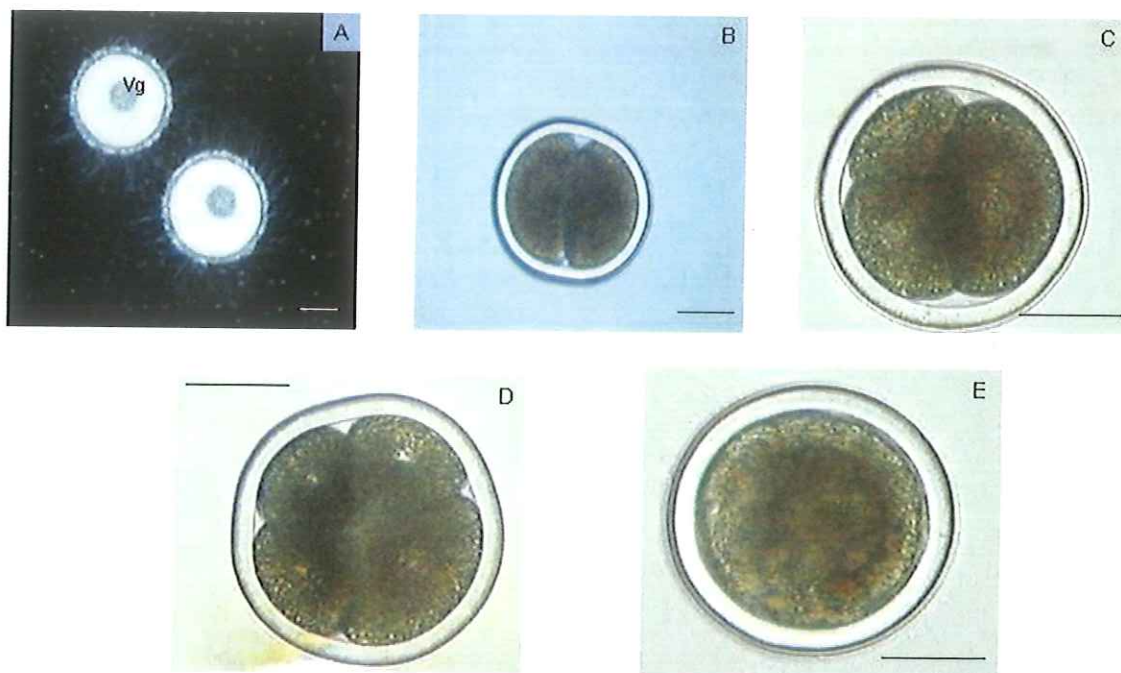


Fig.19. *Pareurythoe californica*. Desarrollo embrionario. A. Fertilización. Se observan ovocitos maduros (90µm) y espermias que se ven como filamentos luminosos alrededor de los ovocitos. B. Primera división celular. Formación de dos blastómeros, dos horas y media postfertilización. C. Formación de tres blastómeros, tres horas postfertilización. D. Segunda división celular. Formación de cuatro blastómeros, cuatro horas postfertilización. E. Estadio mórula. 17 horas postfertilización. Vg; vesícula geminal. Barras= 30µm.

### 5.8.2 Desarrollo larvario

El estadio blástula se observó 24 horas después de la fertilización con un diámetro aproximado de  $90\mu\text{m}$  (Fig. 20A). En esta etapa se puede notar en algunas larvas el inicio del desarrollo de la corona de cilios que permite que estas comiencen a moverse. Es hasta el segundo día de vida de la larva que se pudo visualizar una blástula ciliada bien desarrollada con movimiento en la mayoría de los organismos (Fig. 20B). Al tercer día se observó una gástrula avanzada. El proceso de organogénesis se aprecia con claridad en el interior del cuerpo de la larva (Fig. 20C).

El cuarto día fue posible ver en algunos individuos la aparición de dos manchas oculares (Fig. 20D). Debido a esto a partir de esta etapa fue posible delimitar la parte anterior del organismo. Es también en esta misma etapa cuando la prototroca (corona de cilios) comienza su posicionamiento en el tercio superior del organismo delimitándose esta zona del cuerpo de la larva. En esta misma zona se identificaron un par de quetas inicialmente de  $40\mu\text{m}$  de cada lado que crecen hacia la parte posterior del individuo (Fig. 20E). El quinto día se observó la aparición de dos pares de quetas largas o nectoquetas ( $200\mu\text{m}$ ) que crecen en cada costado del individuo en el mismo lugar donde se apreciaron un par de quetas cortas 24 horas antes (Fig. 20F). El penacho apical no es visible mediante la observación en luz transmitida. Sin embargo en campo oscuro fue posible identificarlo en la porción más anterior de los individuos (Fig. 21A).

Al sexto día fue notorio el comienzo del proceso de elongación que el organismo sufre en dirección a la porción posterior (Fig. 21B). A partir de este momento la larva sufrió un largo y lento proceso de elongación que continuo hasta dos meses sin presentarse signos de metamorfosis. Las larvas en prome-

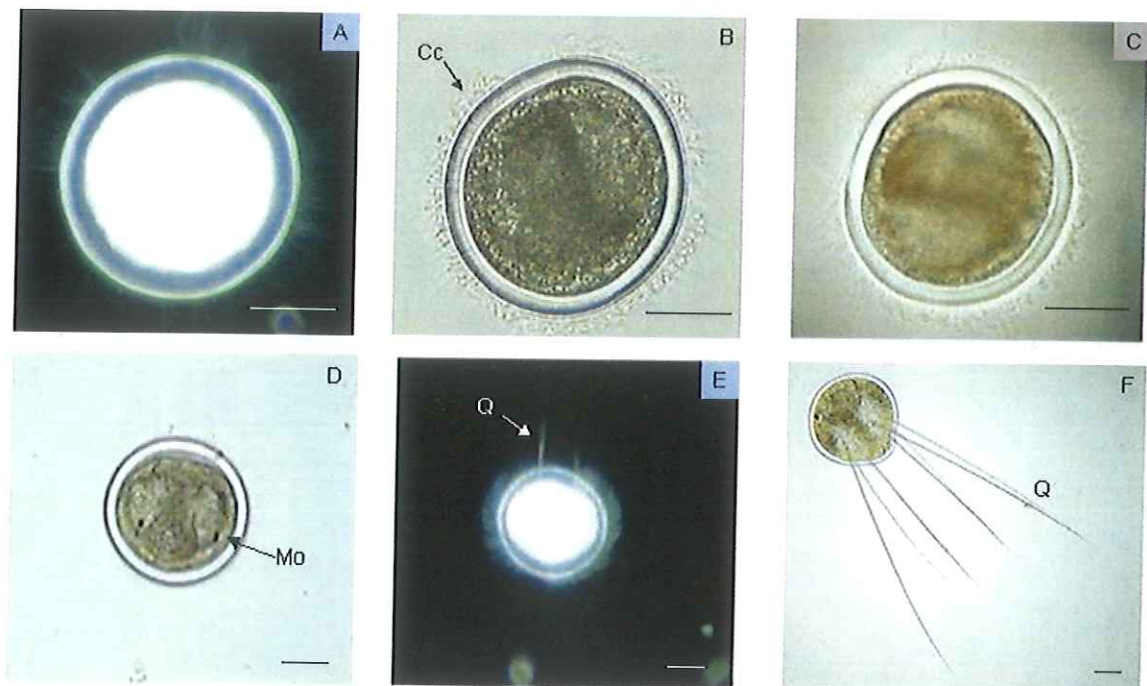


Fig.20. *Pareurythoe californica*. Desarrollo larvario (Parte 1). A. Blástula temprana, 24 horas postfertilización. B. Blástula, dos días - postfertilización. C. Gástrula avanzada, tres días postfertilización. D. Desarrollo de manchas oculares y E. Desarrollo de un par de quetas de 40 $\mu$ m. Ambas estructuras se observan cuatro días postfertilización. F. Desarrollo de dos pares de nectoquetas de 200 $\mu$ m, de cada lado del cuerpo de la larva, cinco días postfertilización. Cc; corona de cilios bien desarrollada. Mo; manchas oculares. Q; quetas. Barras= 30 $\mu$ m.

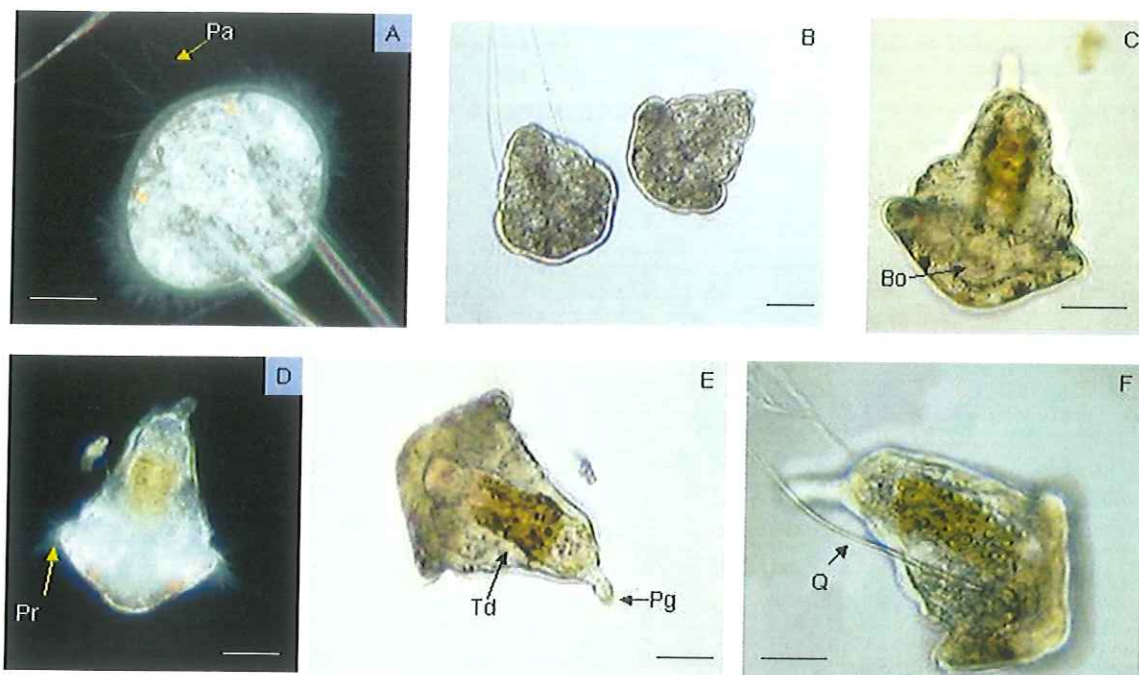


Fig. 21. *Pareurythoe californica*. Desarrollo larvario (parte 2). A. Detalle del penacho apical en larva nectoqueta, cinco días postfertilización. B. Larva nectoqueta planctotrófica, seis días postfertilización. C. Larva nectoqueta planctotrófica, ocho días postfertilización. D. Detalle de la protroca que se encuentra en el tercio superior de la larva al mismo nivel que la boca (ver Figura anterior). E. Detalle del pigdium en la zona más posterior del organismo y del tubo digestivo a lo largo del cuerpo de la larva. F. Vista del perfil del organismo donde se observa que las nectoquetas nacen en el tercio superior del organismo. Pa; penacho apical. Bo; boca bien desarrollada. Pr; protroca. Pg; pigdium. Td; tubo digestivo. Q; nectoqueta. Barras=30 $\mu$ m.

dio crecieron  $130\mu\text{m}$  con valores máximos de  $150\mu\text{m}$  en algunos individuos. En esta etapa es cuando se desarrolló una larva nectoqueta planctotrófica. Debido a que la cutícula de la larva es translúcida fue posible apreciar la formación del tubo digestivo a lo largo del cuerpo del organismo (Fig. 21C,E) y la boca que se observa en el tercio superior de la larva, al mismo nivel que la prototroca (Fig. 21D). La boca desarrolla una banda de cilios que permanece en movimiento constante para crear corrientes de agua y atraer alimento hacia ella. A partir de este momento se alimentó a la larva con la microalga *Isochrysis galbana*. El pigidio es apreciable en la parte más posterior del individuo (Fig. 21E). Se observó que las quetas crecen en medios de cultivo estáticos y se pierden en medios con agitación brusca. Estas nacen en el tercio superior del cuerpo del organismo (Fig. 21A,F).

Finalmente en el experimento de inducción a la metamorfosis con KCl no se observaron cambios dramáticos en la morfología de la larva que dieran señales de metamorfosis.

## 6. DISCUSION

### 6.1 Efecto del fotoperiodo

#### 6.1.1 Maduración y crecimiento

Los resultados obtenidos mostraron que el fotoperiodo ejerció influencia sobre la maduración y el crecimiento de *Pareurythoe californica*. El tiempo de exposición en ambas condiciones de luz (LO 12:12 y LO 0:24) tuvo un efecto significativo sobre el incremento en peso de los organismos. Todo indica que en los poliquetos expuestos al fotoperiodo neutral se aceleró el proceso de ovogénesis en relación a los poliquetos expuestos al fotoperiodo de oscuridad total. Esto se vio reflejado en que los organismos del fotoperiodo neutral manifestaron una tendencia a producir ovocitos de mayor tamaño. Fue en este fotoperiodo donde a los dos meses de experimentación se observó por primera vez la presencia de ovocitos en tallas tempranas de desarrollo (entre 30 y 60 $\mu$ m) como producto de un comienzo en el proceso de gametogénesis. La disminución en las tallas de ovocito maduro de ambos tratamientos fue producto de desoves los cuales no fue posible cuantificar. Sin embargo fue posible apreciar que las hembras expuestas al fotoperiodo neutral comenzaron primero el proceso de gametogénesis que las hembras sometidas al fotoperiodo de oscuridad total.

Por otro lado al final del experimento la distribución del diámetro de los ovocitos de los poliquetos sometidos al fotoperiodo neutral se encontraba desfasada a la derecha de la distribución de los ovocitos del fotoperiodo de obscuridad total. Lo cual indica que los ovocitos de los poliquetos de este tratamiento presentaron un mayor tamaño al final del experimento. Esto se pudo observar tanto en el grupo de ovocitos de diámetros de desarrollo temprano ( $< 60\mu\text{m}$ ) como en el grupo de ovocitos de las tallas finales de desarrollo ( $> 60\mu\text{m}$ ).

Efectos similares se han obtenido en otras especies de poliquetos expuestas a fotoperiodos neutrales. En el poliqueto nereido *Neanthes limnicola* de California central se observó que el fotoperiodo de 12 horas o menos de duración de luz, funciona como un detonador exógeno que induce a la reproducción. Una vez recibido este impulso del medio se da una rápida gametogénesis en los meses de otoño he invierno donde el crecimiento de los ovocitos es estimulado por el decremento de la duración del día. La culminación del largo proceso de gametogénesis y la liberación de los juveniles, momento en que estos nacen al salir de la cavidad celómica de los reproductores, ocurre durante el periodo del año en el que se da una vez más un incremento en la duración de la luz del día (Fong y Pearse, 1992a). El citado trabajo reveló evidencias de que en estos organismos existe un ritmo circanual endógeno que responde al incremento ó decremento en la duración de la luz del día.

Por otra parte en el nereido *Nereis (Neanthes) virens* el crecimiento de los ovocitos fue rápido cuando los organismos fueron expuestos a un fotoperiodo entre 12 y 13 horas de luz. En poliquetos expuestos a fotoperiodos de días cortos ; LO 9:15, 11:13 y 12:12 el diámetro promedio de los ovocitos fue mayor al de poliquetos expuestos a fotoperiodos de días largos ; LO 13:11 y 15:9 (Olive et al., 1998). *N. virens* es capaz de responder con cambios en su estado reproductivo al ser expuesta a fotoperiodos de LO 16:8 y LO 8:16 en todas las épocas del año. Esto sugiere que en estos organismos existe un sistema de "consulta continua" de las condiciones medio ambientales de luz que controla su condición reproductiva (Olive et al., 1998).

El polinoideo *Harmothoe imbricata* también es influenciado por un ritmo circanual que es fundamental en su ciclo reproductivo. Se ha observado que sometiendo estos organismos a un fotoperiodo de 13 horas de luz o menos se puede lograr una ovogénesis exitosa (Lawrence, 1996). En poliquetos de la misma especie colectados en invierno y transferidos a un fotoperiodo de días largos de LO 16:8 se observó que la tasa de vitelogénesis fue mayor en comparación con poliquetos mantenidos en un fotoperiodo de días cortos LO 8:16 ( Watson et al., 2000b).

Evidentemente hay una diferencia en cuanto a que *N. (N.) virens* ó *N. limnicola* son poliquetos de ciclos reproductivos anuales. Mientras que *P. californica* ó *H. imbricata* son especies de ciclos reproductivos de cinco y cuatro meses respectivamente. En el medio natural las dos primeras especies en su estado adulto pueden llegar a crecer hasta un metro de longitud mientras que las otras dos especies en el medio natural crecen un máximo cinco centímetros de longitud. Sin embargo las cuatro especies coinciden en primer lugar en que su maduración se ve afectada por el fotoperiodo y en segundo lugar en que todas experimentan una respuesta característica a los fotoperiodos cercanos al de LO 12:12, lo que provoca cambios determinantes en el proceso de gametogénesis.

El hecho de que al final del experimento los organismos del fotoperiodo neutral hayan tenido diámetros de ovocito mayores y menor peso húmedo y que los organismos del fotoperiodo de obscuridad total tuvieran menores diámetros de ovocito y mayor peso húmedo posiblemente se debe a que en fotoperiodos cercanos a las 12 horas de luz ,en el otoño, los organismos están en la etapa terminal del proceso de gametogenesis y la prioridad es terminar de transferir rápidamente energía de los tejidos a los gametos dándose un crecimiento más acelerando de los ovocitos. Por el contrario en fotoperiodos cercanos a las 15 horas de luz en el verano es cuando debe dar inicio el proceso de

gametogénesis. En este momento posiblemente la mayor prioridad es acumular energía en los tejidos y no la de madurar.

En poliquetos nereidos está comprobado que existe relación entre crecimiento y maduración. En el poliqueto *N. (N.) virens* se ha comprobado que el crecimiento es directamente influenciado por el fotoperiodo. Se ha visto que las poblaciones en el medio natural se alimentan más en el verano para acumular reservas energéticas. En la transición otoño-invierno época de fotoperiodos entre 11 y 12 horas de luz se ha demostrado que estos poliquetos tienen una respuesta característica al equinoccio de otoño sufriendo un cambio en el estado fisiológico de los organismos en cuanto a crecimiento y alimentación. Esto puede deberse a que durante el invierno, temporada en la que se da un decremento en la duración de la luz del día, disminuyen su tasa de alimentación y distribuyen la energía de sus tejidos somáticos a las células germinales. Se ha observado que esta reducción en su alimentación está asociada a una fase rápida de crecimiento de ovocitos (Last y Olive, 1999). En el laboratorio se ha observado un incremento en la tasa de alimentación, crecimiento y proliferación de segmentos cuando son expuestos a fotoperiodos de LO 16:8 comparado con LO 8:16 (Last y Olive, 1999).

En lo que respecta a la especie en estudio los resultados de incremento en peso obtenidos en el fotoperiodo de total oscuridad indican que estos

organismos son de hábitos nocturnos. Por este motivo, registraron un mayor peso promedio en todas las evaluaciones. En fotoperiodos similares a días cortos como lo sería el de total oscuridad los organismos están en época de desove y al haber terminado la época de gametogénesis a principios del otoño la energía obtenida por el alimento posiblemente es aprovechada nuevamente para crecer.

En dos muestreos realizados del medio natural durante épocas diferentes del año (primavera y otoño) se observó que la distribución de pesos de la población de organismos colectada en marzo tuvo diferencias significativas a la población colectada en octubre. Los organismos colectados en primavera se encontraron inmaduros y los colectados en otoño se encontraron maduros. Todo indica que en primavera empieza la época de gametogénesis y en otoño finaliza para dar inicio a la época de desove.

La proporción de sexos durante el experimento indica que después de dos meses aumentó el número de organismos maduros de ambos sexos y disminuyó el número de organismos indeterminados. La población estaba en pleno proceso de gametogénesis. Al final del experimento el número de organismos indeterminados aumentó abruptamente y por consecuencia el número de organismos maduros de ambos sexos disminuyó. Si bien lo anterior no se cuantificó directamente todo indica que fue debido a un desove.

Proporciones de sexo similares a las de *P. californica* se han encontrado en otros amphinomidos. En *Eurythoe complanata* que tiene un ciclo reproductivo anual alternado entre asexual y sexual se ha observado que se reproduce asexualmente en primavera mediante la ruptura del cuerpo en una o más partes regenerando cabezas, colas o ambas y en verano se reproduce sexualmente. En este periodo madura solamente el 13% de la población en una proporción de sexos 1:1 (Kudenov, 1974). *Benthoscolex cubanus* un amphinomido que vive en el intestino de erizos de mar de profundidades abisales se reproduce todo el año y su proporción de sexos es 1:1 (Beesley et al., 2000).

Valores similares a la proporción de sexos 1:1 se han reportado en la mayoría de los poliquetos de las diferentes familias. Por ejemplo, en el terebellido *Nicolea zostericola* se encontró una proporción de sexos de 0.84 machos/ hembra. El 45% fueron hembras, el 38% fueron machos y el 13% fueron indeterminados. (Eckelbarger, 1974). En el sabellido *Sabella spallanzanii* se encontró una proporción de sexos 1:1 (Giangrande et al., 2000). En el alvinellido *Paralvinella grasslei* de chimeneas hidrotermales también se encontró una proporción de sexos 1:1 (Zal, 1995). Sin embargo existen excepciones donde la proporción de machos es mayor a la de hembras. Por ejemplo, el hesionido *Hesiocaeca methanicola* que habita en grandes

profundidades se encontró una proporción de sexos de 1.86 machos/hembra. De 68 organismos muestreados 60% fueron machos, 32% fueron hembras y 7% indeterminados (Eckelbarger et al., 2001). Asimismo en el polinoideo *Branchipolynoe seepensis* que habita chimeneas hidrotermales se encontró una proporción de sexos de 1.5 machos/hembra. De 47 organismos muestreados 60% fueron machos y 40% fueron hembras (Jollivet et al., 2000).

### 6.1.2 Fecundidad

Se pudo observar que estos organismos tienen una buena correlación entre peso húmedo y fecundidad. A mayor peso húmedo mayor fecundidad. En promedio una hembra de 700 mg. desovó 271,522 ovocitos de 90 $\mu$ m de diámetro. Ambos sexos liberan sus gametos por la parte más posterior del animal. Esto coincide con lo visto en la mayoría los amphinómidos conocidos que son de fertilización externa. Se ha visto que desarrollan sus gametos en las paredes del intestino y los liberan mediante contracciones musculares por el pigidio (Rouse y Pleijel, 2001).

En poliquetos los tamaños de ovocito varían entre 40 $\mu$ m y 1.36 mm. Las hembras pueden producir desde un huevo a la vez en pequeñas especies intersticiales hasta miles de huevos en nereidos y otras familias. Los ovocitos de tamaños menores a 180 $\mu$ m generalmente tienen un desarrollo planctotrófico

mientras que los ovocitos grandes tienden a un desarrollo directo (Eckelbarger, 1986).

En la familia Terebellidae los tamaños de huevo y la fecundidad varían de acuerdo al modo de reproducción. *Eupolyornia crescentis* y *Neoamphitrite robusta* son especies que desovan libremente en el bentos y tienen fecundidades de 128,500 y 830,000 ovocitos respectivamente, con diámetros máximos de ovocito de 210 y 180 $\mu$ m respectivamente. En contraste *Thelepus crispus* incuba sus larvas en tubos maternos y desarrolla diámetros máximos de ovocito de 400 $\mu$ m. Manteniendo hasta 51,500 larvas. Por otra parte *Ramex californiensis* desarrolla diámetros máximos de ovocito de 410 $\mu$ m e incuba sus larvas en capullos de 44 larvas (McHugh, 1993).

En la familia Spionidae se ha observado que especies del mismo género pueden tener distintos tipos de desarrollo y existe relación entre la fecundidad, el tamaño de ovocito y la cantidad de energía contenida en los embriones. *Streblospio shrubsolii* es de desarrollo directo, su diámetro máximo de ovocito es de 230 $\mu$ m y su fecundidad es de 20 a 50 ovocitos por hembra. En *S. benedicti* especie en la que se han observado dos tipos de reproducción, las hembras con embriones de desarrollo lecitotrófico desarrollan ovocitos con diámetros máximos de 100 a 200 $\mu$ m y producen entre 10 y 100 ovocitos. A diferencia de las hembras que producen embriones de desarrollo planctotrófico

como *S. benedicti* que desarrolla ovocitos de diámetros máximos de 90 $\mu$ m y produce entre 100 y 600 ovocitos y las hembras de *S. n.sp.* que desarrollan ovocitos de diámetros máximos de 70 $\mu$ m y producen entre 100 y 700 ovocitos (Bridges, 1993). En los primeros dos casos en los que son organismos de desarrollo lecitotrófico y directo, los ovocitos maduros son de mayor tamaño, la fecundidad es menor y se ha comprobado que los embriones contienen significativamente más energía en los tejidos que los embriones desarrollados por los organismos de desarrollo planctotrófico que tienen ovocitos de diámetros menores de ovocito maduro y mayores fecundidades (Bridges, 1993). El poliqueto estudiado en el presente trabajo pertenece a las especies que producen ovocitos de diámetros pequeños que desarrollan una larva trocófora planctotrófica y que tienen altas fecundidades.

### 6.1.3 Tinción de cromosomas

El método más adecuado para teñir los ovocitos de esta especie fue el de orceina, debido a la rapidez con la que se tiñeron los ovocitos y la nitidez con la que se observaron los cromosomas. El estadio de meiosis en que se encontraron los ovocitos maduros coincidió con la mayoría de las especies de poliquetos que se han estudiado. Se ha visto que generalmente los ovocitos maduros se encuentran en estadio profase de meiosis durante el desove. Por ejemplo, en el poliqueto *Arenicola marina* los ovocitos son arrestados en estadio

profase hasta el desove (Meijer, 1980). En el nephtydo *Nephtys hombergii* los ovocitos permanecen en profase desde los estadios tempranos de vitelogenesis hasta el desove. En el terebellido *Nicolea zostericola* los ovocitos permanecen arrestados en profase durante todo el proceso de vitelogenesis y hasta después del desove (Eckelbarger, 1975). En algunas especies después del desove los ovocitos entran a metafase I de meiosis (Strathmann, 1987).

En el nereido *Platynereis dumerilii* los ovocitos que se encuentran en las primeras fases de crecimiento se observan en estadio Interfase de meiosis y los ovocitos maduros en profase (Fisher, 1974). Estos resultados coinciden con el presente trabajo ya que los ovocitos de entre 40 y 50 $\mu$ m se encontraban en estadio interfase de meiosis debido a que los cromosomas se observaron difusos en el núcleo y los ovocitos maduros estaban en estadio profase de meiosis debido a que los cromosomas se visualizaron claramente dispersos. Existen excepciones como el cirratulido *Cirratulus cirratus* en el que los ovocitos entran al estadio metafase I de meiosis antes de ser desovados (Olive, 1971).

## 6.2 Periodo larvario

En condiciones de laboratorio *Pareurythoe californica* tuvo porcentajes de fertilización arriba del 95% la mayor parte del año mediante la extracción manual de los gametos. Estos resultados no son posibles de obtener en todas las especies. Por ejemplo, el sabellido *Sabella spallanzanii* solo se puede fertilizar exitosamente cuando las hembras desovan naturalmente (Giangrande et al., 2000).

Después de la fertilización, la especie en estudio presentó un típico desarrollo en espiral y tanto los ovocitos como los embriones miden en promedio 90 $\mu$ m. Se ha observado que el tamaño de ovocito generalmente determina el patrón de las divisiones celulares durante el desarrollo embrionario. Los ovocitos debajo de 100 $\mu$ m tienden a tener un desarrollo en espiral. Mientras que los ovocitos grandes se dividen desigualmente (Eckelbarger, 1986).

Cultivado a temperaturas entre los 17 y 20 °C, el cigoto de *Pareurythoe californica* que desarrolla una larva trocófora planctotrófica comienza a dividirse entre 2 y 2.5 horas después de la fertilización. A partir de este momento se divide en promedio cada hora. Los embriones de las masas gelatinosas de *Lumbrineris latreilli* se dividen en promedio cada hora a partir de la aparición del

primer lóbulo polar, 1.5 horas después de la fertilización, cultivados a 20 °C (Masanori et al., 1982). Por otro lado especies que viven en temperaturas debajo de los 0 °C y que habitan grandes profundidades como los embriones del hesionido *Hesiocaeca methanicola* comienzan sus divisiones celulares 18 horas después de la fertilización dividiéndose cada seis horas (Eckelbarger et al., 2001). Esta diferencia tan marcada en la tasa de división celular entre las especies de aguas poco profundas y las especies de grandes profundidades se debe principalmente a la temperatura. La cual provoca un ritmo más acelerado en el metabolismo celular de los organismos que se desarrollan en aguas más templadas en comparación con los organismos que se desarrollan a bajas temperaturas. Los cuales por el contrario tienen un ritmo de división celular mucho mas lento.

Los amphinomidos generalmente desarrollan una larva trocófora llamada "rostraria" presente solamente en esta familia. No existen observaciones sobre la transición entre rostraria y estado adulto. La única evidencia de esta conexión radica en la similitud en las quetas. Estos organismos desarrollan dos tentáculos elongados que posiblemente son utilizados para la alimentación (Rouse y Pleijel, 2001). La especie en estudio no presentó los dos tentáculos elongados en ninguno de sus estadios pero si las quetas similares a las de los adultos. Por otro lado existen casos de desarrollo directo como los poliquetos *Amphinome rostrata* y el hermafrodita *Hipponoa gaudichaudi* que se han

encontrado incubando sus huevecillos y se han observado juveniles pegados a las hembras cerca de los parapodios y las branquias (Kudenov, 1977b).

La larva que desarrolla *P. californica* es trocófora planctotrófica y desarrolló dos pares de quetas elongadas y prominentes de cada lado. Estas quetas crecieron abruptamente entre el tercer y cuarto día de vida, resultaron quebradizas y su presencia fue influenciada por el manejo y las condiciones de movimiento en el sistema de cultivo. Generalmente en condiciones estáticas estas quetas crecieron y en cultivos con agitación brusca las perdieron. Es posible que estas quetas sean de carácter provisional. Las quetas provisionales son características de las larvas planctónicas y generalmente son largas y prominentes (Lewis, 1998). Sin embargo este mismo autor menciona que existen excepciones debido a que en espiónidos del género *Dipolidora* se ha observado que estas quetas se encuentran presentes tanto en larvas planctónicas como en larvas no planctónicas. En el mismo trabajo se menciona que las quetas provisionales no siempre tienen una forma elongada. La larva de *D. armata* las desarrolla cortas y corpulentas.

El penacho apical se observó a partir del estadio blástula y solamente fue apreciable en campo oscuro. El penacho apical esta presente en la mayoría de los poliquetos. Su función es incierta y existen pocas descripciones detalladas. Parece jugar un papel sensorial y su orientación influencia la dirección del

movimiento (Grant , 1981). Los cambios en el comportamiento de la larva del serpulido *Galeolaria caespitosa* son correlacionados con la organización de las estructuras ciliares. Los cilios juegan un papel sensorial en la selección del substrato. La aparición de cilios en la cabeza y el pigidio ocurren cuando la larva comienza a permanecer en el fondo de los recipientes de cultivo. La prototroca y el penacho apical se pierden en su fase demersal (Grant , 1981).

Las larvas de *P. californica* fueron mantenidas hasta dos meses sin lograrse la metamorfosis y puede haber varios motivos por los cuales no se llegó a esta etapa. Es posible que faltase aun mas tiempo para que las larvas llegaran a estar competentes para la metamorfosis y por lo tanto, que tengan una vida pelágica aun más larga. Sin embargo también es posible que en las condiciones de cultivo en las que se mantuvieron las larvas haya faltado el inductor natural para metamorfizarse que se encuentra en el medio donde se desarrollan. En el experimento de inducción a la metamorfosis con KCl no se observaron indicios de algún cambio morfológico dramático en la larva. Cabe mencionar que algunas larvas sobrevivieron una semana en el medio con KCl.

## 7. CONCLUSIONES

- El fotoperiodo ejerció influencia sobre la maduración y el crecimiento del poliqueto *Pareurythoe californica*.
- En los poliquetos expuestos al fotoperiodo neutral se aceleró el proceso de ovogénesis en relación con los poliquetos expuestos al fotoperiodo de oscuridad total.
- Al final del experimento los organismos del fotoperiodo de oscuridad total presentaron en promedio mayor peso.
- En el medio natural estos organismos comienzan el proceso de gametogénesis en el verano finalizándolo a principios de otoño. En condiciones de laboratorio puede iniciar en invierno.
- *P. californica* desova sus ovocitos en estadio profase de meiosis con diámetros promedio de 90 $\mu$ m y máximos de 100 $\mu$ m y es posible obtener porcentajes de fertilización mayores al 90% la mayor parte del año en condiciones de laboratorio.

- Se logró documentar el desarrollo embrionario y el larvario hasta el estadio nectoqueta. Las larvas se mantuvieron por un periodo máximo de dos meses sin llegar a metamorfizarse.

## 8. LITERATURA CITADA

- Beesley T. (2000) Polychaetes & allies; The southern synthesis fauna of Australia. Depart. of the environment and heritage. Australia. Vol.4A pp.465.
- Bridges T.S. (1993) Reproductive investment in four developmental morphs of *Streblospio* (Polychaeta: Spionidae). Biol.Bull., 184:144-152.
- Brown B. (1993) Maine's Baitworm Fisheries: Resources at Risk ? Amer. Zool., 33:568-577.
- Eckelbarger K.J. (1974) Population biology and larval development of the Terebellid polychaete *Nicolea zostericola*. Mar. Biol., 27: 101-113.
- Eckelbarger K.J. (1975) A light and electron microscope investigation of gametogenesis in *Nicolea zostericola* (Polychaeta:Terebellidae). Mar. Biol., 30: 353-370.
- Eckelbarger K.J. (1986) Vitellogenic mechanisms and the allocation of energy to offspring in polychaetes. Bull. Mar. Sci., 39(2): 426-443.
- Eckelbarger K.J., Young C.M., Ramírez Llodra, Brooke S. y Tyler P. (2001) Gametogenesis, spawning behavior, and early development in the "iceworm" *Hesiocaeca methanicola* (Polychaeta: Hesionidae) from methane hydrates in the Gulf of Mexico. Mar. Biol., 138: 761-775.
- Fauchald K. y Rouse G. (1997) Polychaete systematics: past and present. Zool. Scr., 26:71-138.
- Fischer A. (1974) Stages and stage distribution in early oogenesis in the annelid, *Platynereis dumerilii*. Cell Tiss. Res., 156:35-45.
- Fong P.P. y Pearse J. (1992) Evidence for a programmed circannual life cycle modulated by increasing daylengths in *Neanthes limnicola* (Polychaeta:Nereidae) from central California. Bio.Bull., 182: 289-297.
- Giangrande A. (1997) Polychaete reproductive patterns, life cycles and life histories: an overview. Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev., 35:323-386.
- Giangrande A., Licciano M., Pagliara P. y Gambi M.C.,(2000) Gametogenesis and larval development in *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae) from the Mediterranean Sea. Mar. Biol., 136:847-861.

- Grant N.J. (1981) A scanning electron microscopic study of larval development in the marine polychaete, *Galeolaria caespitosa* Lamarck (Serpulidae). Cell Tiss. Res., 215:171:179.
- Harris C., Fierro S., Cerda A., Domínguez D., Echanove J.J, Ferreiro I., Garay K., García B., González J., González J.C., Lara R., López A.C., Martínez J., Montalvo M., Nieto R., Ocegüera A., Orozco C., Sánchez G., Torres A. L., Varela S., Vital V., Zavala J.O. y Gould M.C. (2002) Maduración y fecundación *in vitro* de los ovocitos de *Pteria sterna* (Gould, 1851, Molusca). Ciencias Marinas. 28(2): 149-156.
- Highnam C.K. y Hill L. (1969) The comparative endocrinology of the invertebrates. Edward Arnold (Publishers). London. Great Britain 270 pp.
- Jollivet D., Empis A., Baker M.C., Hourdez S., Comtet T., Jouin-Toulmond, Desbruyeres y Tyler P.A. (2000) Reproductive biology, sexual dimorphism, and population structure of the deep sea hydrothermal vent scale-worm, *Branchipolynoe seepensis* (Polychaeta: Polynoidae). J. Mar. Biol. Ass. U. K., 80:68-54.
- Kudenov J.D. (1974) The reproductive biology of *Eurythoe complanata* (Palles, 1766) Polychaeta: Amphinomidae. unpublished dissertation, Univ. of Arizona, xi 128 pp.
- Kudenov J.D. (1977b) *Hipponoe gaudichaudi* (Polychaeta: Amphinomidae). Bull. Sou. Cal. Acad. Sci., 76: 85-90.
- Last K.S. y Olive P.J.W. (1999) Photoperiodic control of growth and segment proliferation by *Nereis (Neanthes) virens* in relation to state of maturity and season. Mar.Biol., 134: 191-199.
- Lawrence A.J. (1996) Environmental and endocrine control of reproduction in two species of polychaete: potential bio-indicators for global climate change. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 76:247-250.
- Lewis J.B. (1998) Reproduction, larval development and functional relationships of the burrowing, spionid polychaete *Dipolydora armata* with the calcareous hydrozoan *Millepora complanata*. Mar.Biol., 130:651-662.
- McHugh D. (1993) A comparative study of reproduction and development in the Polychaete Family Terebellidae. Biol.Bull., 185:153-167.

- Meijer L. (1980) Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (Annelida, Polychaeta). *Develop. Growth and Differ.*, 22(1): 33-38.
- Sato M., Tsuchiya M. y Nishihira M., (1982) Ecological aspects of the development of the polychaete, *Lumbrineris latreilli* (Audouin et Milne-Edwards): Significance of direct development and non-simultaneous emergence of the young from the jelly mass. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tôhoku Univ.*, 17:17-28.
- Sokal R.R. y Rohlf F.J. (1981) *Biometry*. 2<sup>nd</sup> Ed. U.S.A. pp 859
- Stephano J.C. y Gould M. (1981) Curso teórico-practico sobre manejo de gametos y la utilización de un método para detectar y evitar polispermia en el ostión *Crassostrea gigas* y producción de triploides. Universidad Autónoma de Baja California, Escuela superior de ciencias pp. 36
- Olive P.J.W. (1971) Ovary structure and oogenesis in *Cirratulus cirratus* (Polychaeta: Cirratulidae). *Mar. Biol.*, 8: 243-259.
- Olive P.J.W. (1984) Environmental control of reproduction in Polychaeta. *Fortschr. Zool.*, 29: 17-38.
- Olive P.J.W., Rees S.W. y Djunaedi A. (1998) Influence of photoperiod and temperature on oocyte growth in the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) virens*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 172:169-183.
- Pernet B., P-Y Qian, Rouse G., C.M. Young y Eckelbarger K.J. (2002) Chapter 12 Phylum Annelida: Polychaeta en: *Atlas of marine invertebrate larvae*, C. M. Young. pp. 209-243.
- Pinon E. (2000). Producing ragworms for shrimp broodstock maturation. *Global Aquaculture Advocate*, 3(2): 82-84.
- Reish D.J. (1974) The establishment of laboratory colonies of polychaetous Annelids. *Thalassia Jugoslavica* 10 (1/2) 181-195.
- Rouse G.W. y Pleijel F. (2001) *Polychaetes*. Oxford Univ. Press. 354 pp.
- Salazar V. (1988). *Poliquetos (Annelida: Polychaetes) de México*. Libros Universitarios. Universidad Autónoma de Baja California Sur. pp 212
- Smith W.L. y Chanley M.H. (1975) *Culture of marine invertebrate animals*. Ed. Plenum Press. New York. 338pp.

- Strathmann M.F. (1987) Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific Coast. Data and Methods for the study of eggs , embryos, and larvae. University of Wash. Press 670pp.
- Watson G.J., Williams M.E. y Bentley M.G. (2000a) Can synchronous be predicted from environmental parameters? A case study of the lugworm *Arenicola marina*. Mar. Biol., 136:1003-1017.
- Watson G.J., Langford F.M., Gaudron S.M. y Bentley M.G. (2000b) Factors influencing spawning and pairing in the scale worm *Harmothoe imbricata* (Annelida: Polychaeta). Biol. Bull., 199: 50-58.
- Zal F., Jollivet D., Chevaldonné P. y Desbruyeres D. (1995) Reproductive biology and population structure of the deep-sea hydrothermal vent worm *Paralvinella grasslei* (Polychaeta: Alvinellidae) at 13°N on the East Pacific Rise. Mar.Biol.,122:637-648.
- Zar J.H. (1984) Biostatistical analysis, 2<sup>nd</sup> Ed. Prentice Hall, U.S.A., New Jersey.
- Zar J.H. (1999) Biostatistical analysis, 4<sup>a</sup> Ed. Prentice Hall, U.S.A., New Jersey.

9. A N E X O

Tabla IV. *Pareurythoe californica*. Resultados estadísticos de la frecuencia de los individuos en el diámetro de los ovocitos mediante un análisis Log-lineal por tablas de contingencia. Donde se probó el efecto de las variables: Fotoperiodo, tamaño de ovocito y tiempo de experimentación con sus posibles interacciones.

EFFECTO	P < 0.05
Fotoperiodo	0.504877
Tamaño de ovocito	0.000000
Tiempo	0.019249
Fotoperiodo/Clase	0.688384
Fotoperiodo/Tiempo	0.636335
Tamaño de ovocito/Tiempo	0.000007

Tabla V. *Pareurythoe californica*. Resultados estadísticos de la frecuencia del diámetro de los ovocitos mediante un análisis Log-lineal por tablas de contingencia. Donde se probó el efecto de las variables: Fotoperiodo, tamaño de ovocito y tiempo de experimentación con sus posibles interacciones.

EFFECTO	P < 0.05
Fotoperiodo	0.000000
Tamaño de ovocito	0.000000
Tiempo	0.000000
Fotoperiodo/Tamaño de ovocito	0.000000
Fotoperiodo/Tiempo	0.015804
Tamaño de ovocito / Tiempo	0.000000

Tabla VI. *Pareurythoe californica*. Resultados estadísticos de la frecuencia del diámetro de los ovocitos por intervalo de peso mediante un análisis Log-lineal por tablas de contingencia. Donde se probó el efecto de las variables: Tiempo de experimentación (T), Fotoperiodo (F), intervalo de peso (IP), Tamaño de ovocito (C) con sus posibles interacciones.

EFEECTO	P < 0.05
Tiempo	0.037792
Fotoperiodo	0.000000
Intervalo de peso	0.000000
Tamaño de ovocito	0.000000
T/F	0.000000
T/IP	0.000000
T/C	0.000000
F/IP	0.000000
F/C	0.000000
IP/C	0.000000
T/F/IP	0.000000
T/F/C	0.000000
T/IP/C	0.000000
F/IP/C	0.000000
T/F/IP/C	0.000000

