

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO EMBRIOLOGÍA

**ESTUDIO DEL CICLO GONADAL Y DETERMINACIÓN DE LA FECUNDIDAD
POTENCIAL DE *Ostrea chilensis* EN EL ESTUARIO DE QUEMPILLÉN ANCUD,
CHILOÉ.**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

YASNA PAOLA SAAVEDRA CARMONA

VALDIVIA-CHILE

2002

PROFESOR PATROCINANTE :

Dr. Orlando Garrido O. _____

Nombre

Firma

PROFESOR COPATROCINANTE:

Dr. Roberto Jaramillo S. _____

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES:

Dr. Ricardo Enriquez S. _____

Nombre

Firma

Dr. Renato Gatica G. _____

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 27 de Diciembre del 2002.

INDICE

CAPÍTULO	página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODO	8
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	29
8. BIBLIOGRAFÍA	30
9. ANEXOS	36

1. RESUMEN

“Estudio del Ciclo Gonadal y Determinación de la Fecundidad Potencial de *Ostrea chilensis* en el Estuario de Quempillén Ancud, Chiloé”

El ciclo reproductivo de *Ostrea chilensis* es un proceso cíclico cuya periodicidad se relaciona con las fluctuaciones de las temperaturas de las aguas, las que están reguladas por la latitud o área geográfica así como por la estacionalidad. Es por esto que se estudió el ciclo reproductivo y cuantificó la fecundidad potencial de *Ostrea chilensis* en el Estuario de Quempillén Ancud, Chiloé. Para observar los eventos que se llevan a cabo dentro de la gónada a lo largo de un año. Las temperaturas del estuario fluctúan entre que van desde 9° C hasta 18,8° C y salinidades con un rango de 28 a 33 partes por mil

Para ello se analizaron mensualmente individuos extraídos de los bancos naturales del estuario en estudio, en un período que abarca de Septiembre del 2000 hasta Septiembre del 2001. A cada ejemplar se le extrajo un trozo de gónada la que fue procesada por técnicas histológica corrientes para luego ser analizadas mediante microscopía óptica, con lo cual se definieron seis estados gonadales estableciendo la dinámica anual de esta especie. Además se analizó un grupo de muestras de diferentes tamaños para determinar el cambio de sexualidad de esta especie.

En *Ostrea chilensis* el primer sexo funcional es el masculino ya que en tallas superiores a 2 cms de longitud se observa sólo tejido gonadal con células en diferente estado de espermiogénesis, luego en individuos sobre 3,5 cms aparece tejido gonadal femenino, para encontrar ovocitos maduros sobre tallas de 4,5 cms de longitud de la concha. También esta especie muestra un alto porcentaje de individuos hermafroditas (51,9%).

El diámetro de los ovocitos maduros van desde 160 hasta 205 μm , con un promedio de 175 μm . La fecundidad potencial de la especie presenta un rango de 5.216 hasta 217.255 ovocitos. La fecundidad real es de 180.000 larvas, las que se obtuvo de una hembra incubatriz, contadas utilizando el programa SIGMA SCAN PRO 5.0 (SPSS).

Ostrea chilensis presenta un hermafroditismo simultáneo. Esta especie presenta una marcada estacionalidad ya que en los meses de primavera-verano alcanza los estados de madurez máxima gonadal y emisión de sus gametos.

Palabras claves: *Ostrea chilensis*, Quempillén, fecundidad potencial y sexualidad.

2. SUMMARY

“Study of gonadal cycle and assesment of potencial fertility of the *Ostrea chilensis* in the Quempillén estuary, Ancud, Chiloé”.

The reproductive cycle of the *Ostrea chilensis* is a cyclic process related with temperature fluctuations of the water, which is regulated by latitude or geographic area, as well as seasonal influences. With this aim a study of reproductive cycle was performed and the quantification of potential fertility of the *Ostrea chilensis* in the Quempillén estuary, Ancud, Chiloé was assessed, in order to describe the events achieved inside the gonad during a whole year. It was found temperatures between 9° to 18,8° C and a range salinity between 28 to 33 per thousands.

A sample of individuals oyster were taken from their natural habitat of the estuary were analyzed monthly in the period from september 2000 to september 2001. A piece of gonad was taken from each individual and processed by current histologic techniques and then the samples were analyzed by optic microscope, establishing six gonad stages and determining the yearly dynamic of the specie. Moreover, a group of different size samples was analyzed, in order to assess the change of sexuality in this specie.

In *Ostrea chilensis*, the first functional sex is male, because in sizes bigger than 2 cm long, only gonadal tissue in different stages of spermiogenesis is observed, then in individuals over 3,5 cm a female gonadal tissue occur, finding mature oocytes over 4,5 cm long of the shell. In addition, a high percentage of hermaphrodite individuals is shown in this specie (51,9%).

The mature oocyte diameter was estimated as 205 µm and the potential fecundity was estimated in 217.255 oocytes for individual which is close to real fecundity values estimated in 180.000 larvae, regarding the gametogenic cycle it was observed.

Ostrea chilensis is a simultaneous hermaphrodite species. The ripening and spawning events occur during spring-summer months. According with food availability and temperature favouring the reproductive events.

Key words: *Ostrea chilensis*, Quempillén, potencial fertility and sexuality.

3. INTRODUCCION

Los moluscos son animales invertebrados de cuerpo blando protegidos por una concha de naturaleza calcárea la cual varía según la clase, estas clase son: Aplacoforos, Monoplacóforos, Poliplacóforos, Escafópodos, Pelecípodos o Bivalvos, Gasterópodos y Cefalópodos (Hickman y col., 1998).

Los moluscos pueden ser encontrados desde los trópicos hasta los mares polares, en altitudes que superan los 7.000 metros y en las profundidades abisales, en charcas, lagos y aguas corrientes, en lagunas, en charcos marinos costeros, en mar abierto. La mayoría de los moluscos viven en el mar, presentando diferentes formas de vida que incluyen a los bentónicos, rastreadores del fondo, excavadores, perforadores y a los de hábitat pelágico (Hickman y col., 1998).

El cuerpo de los moluscos esta dividido en tres regiones o partes: cefálica, pie y la masa visceral. La cabeza y el pie son las zonas más activas, puesto que comprenden la entrada del tubo digestivo, los órganos sensoriales y locomotores, dependiendo principalmente de la función muscular. La masa visceral esta cubierta por una delgada pared corporal o “manto” siendo la porción que contiene los aparatos digestivo, circulatorio, respiratorio y reproductor, ligados a los conductos ciliados para ejercer sus funciones (Storer. 1986).

Una de las clases más importantes del Philum moluscos son los bivalvos o pelecípodos, que son animales con pie en hacha como su nombre lo indica (griego *pelekys* = hacha y *pous* = podos, pie). En este grupo se incluyen entre otras especies, tales como: *Chlamys purpurata* (ostión), *Eurhomalea rufa* (almeja), *Mesodesma donacium* (macha), *Ensis macha* (huepos), *Mytilus chilensis* (chorito), *Ostrea chilensis* (ostra), etc (Hickman y col., 1998).

En general, los bivalvos se caracterizan por tener un cuerpo lateralmente comprimido y encerrado en una concha calcárea rígida formada por dos piezas llamadas valvas las que pueden abrirse por medio de una articulación denominada charnela. Su pie tiene forma de lámina, el cual esta adaptado para cavar y que es manejado por músculos, aunque algunas especies viven fijadas a sustratos y otras viven libremente. El manto esta modificado en forma de sifón para permitir el flujo de agua a lo largo de su cavidad. La mayoría de los bivalvos son filtradores, atrapando mediante una secreción mucosa pequeñas partículas sobre las branquias, las que son llevadas al sistema digestivo (Meglitsch. 1978).

Los bivalvos lamelibranquios se caracterizan por tener branquias en forma laminar las que tienen función respiratoria y digestiva. Estas branquias les permiten el intercambio gaseoso, además de conducir partículas de alimento hasta los palpos labiales entre los que se abre la boca, las que posteriormente son conducidas hasta el estómago a través de un esófago corto (Storer. 1986).

El estómago esta rodeado de glándulas digestivas y provisto de un estilete cristalino de longitud variable que hace rotar las partículas alimenticias, las que son conducidas hacia la abertura de la glándula digestiva y conductos terminales para realizar la absorción y digestión intracelular y eliminar los productos de desecho a través de un surco intestinal hacia el intestino. El intestino es muy largo y esta formado por una o dos asas, el cual presenta un epitelio ciliado con abundantes glándulas mucosas, por medio del cual son eliminadas las heces (Hickman y col., 1998).

En la cavidad pericárdica se encuentra contenido el corazón, incluyendo una porción del aparato digestivo y los nefridios, que tienen la función de excreción (Storer. 1986).

El sistema nervioso de los bivalvos incluye un par de ganglios cerebropleurales interconectados alrededor del esófago y un par de ganglios pediales, próximos a estos encontramos un par de estatocistos como órgano de equilibrio y otro par de ganglios viscerales. Los órganos sensoriales están situados en el borde del manto, que presentan en algunas estructuras como tentáculos provistos de células táctiles y de células quimiorreceptoras además de ocelos sensibles a la luz (Hickman y col., 1998).

Respecto a la sexualidad la mayoría de los bivalvos son dioicos (sexos separados), aunque existen algunas especies que son hermafroditas protándricos (los individuos maduran primero como macho y después como hembra). Los órganos reproductores están constituidos por dos gónadas provistas de gonoconductos ubicados en la zona intestinal a través de los cuales salen los gametos (Hickman y col., 1998).

El desarrollo larval ocurre formando primero una larva trocófora la que nada libremente durante un tiempo breve, para luego transformarse en una larva veliger típica de los moluscos, provista de un velo ciliado el cual se pierde al iniciar la vida bentónica (Iversen. 1982).

Uno de los moluscos bivalvos de importancia comercial es la “Ostra” *Ostrea chilensis*. Esta especie se encuentra distribuida geográficamente (Solís y Eberhard, 1979), desde la Isla de Chiloé en Chile hasta las costas de Ecuador, mientras que batimétricamente se le sitúa entre el intermareal inferior y los 8 mts de profundidad (Solís y Eberhard, 1979). En bancos

naturales, esta especie se fija a un substrato duro mediante su valva inferior. Su extracción se realiza principalmente entre la Isla de Chiloé y las Islas Guaitecas (Solís y Eberhard, 1979).

En relación al ciclo reproductivo de *Ostrea chilensis*, al igual que otros invertebrados marinos, es un proceso cíclico cuya periodicidad se relaciona con la fluctuación de la temperatura de las aguas, las que están reguladas por la latitud o área geográfica así como por la estacionalidad.

La fecundación es de tipo interna donde los espermatozoides son liberados al cuerpo de agua. La fecundación ocurre mediante el ingreso de los espermatozoides a la cavidad paleal producto de las corrientes de agua en el proceso de filtración de la hembra (Winter y col., 1988) y se asocia directamente a los ciclos de alza de temperatura del agua en las que se encuentren las Ostras (Gleisner, 1981; Tomicic y Bariles, 1981; Lepez, 1983; Winter y col., 1983; Chaparro, 1985).

Ostrea chilensis no presenta dimorfismo sexual externo y sólo se pueden reconocer machos de hembras cuando la gónada esta en plena madurez. Solís (1967) señala que en el macho la gónada es de color blanquizca, de textura lisa o con granulaciones finas, en cambio en las hembras la gónada sería de color blanco cremoso con aspecto granuloso o reticular. Solís (1967) también señala que las especies del género *Ostrea* presentan cambios de sexo en las cuales se alternan los estados de macho y hembra. Gleisner (1981) y Götting y col. (1985), señalan que *Ostrea chilensis*, tendría, en general una sexualidad consecutiva rítmica. Gleisner (1981) concluye, que el ciclo reproductivo de los individuos de esta especie y proveniente del banco natural, sería anual y que al momento de la emisión de los gametos, las ostras presentarían un sólo sexo funcional no cambiando al sexo opuesto dentro de la misma estación reproductiva.

La primera madurez reproductiva de *Ostrea chilensis* según Gleisner (1981) se alcanzaría en el segundo año de vida, a una talla aproximada de 25 mm comportándose como machos, paralelo a esto se inicia el proceso de la ovogénesis, el cual termina al año siguiente cuando los individuos alcanzan una talla de 37 mm de longitud de la concha, transformándose en hembras. Gleisner (1981) señala la complejidad de esta alternancia de sexos la que estaría influenciada por fluctuaciones anuales de temperatura y la disponibilidad de alimento. En esta especie presenta una ovogénesis de aproximadamente dos años, destacándose el gran tamaño de sus ovocitos. Los procesos gametogénicos presentan un lento desarrollo invernal y se intensifican en primavera y verano, periodos de máxima temperatura y oferta alimentaria.

El tamaño de los individuos jugaría un papel, tanto o más importante que la edad, en relación con la primera madurez sexual como hembra (Chaparro y Toro, 1989).

Después de ocurrida la fecundación, dentro de la cavidad paleal comienza el desarrollo de los embriones los que posteriormente dan paso a diferentes estados larvales. El período de incubación presenta variaciones según las características ambientales de cada lugar. Según Lepez (1983), en el caso particular del estuario de Quempillén, el período de incubación larval es de aproximadamente de ocho semanas el cual comenzaría a fines de octubre (desove) y las primeras liberaciones larvales ocurrirían a fines de diciembre.

Tanto embriones como larvas viven libres en la cavidad paleal de la madre. Los embriones sin protección externa, comienza la formación de su concha larval, cuando pasan a estado de larva trocófora. En el estuario de Quempillén este estadio se inicia dos a tres semanas post-fecundación (Chaparro y Toro, 1989). Posteriormente las larvas producen su concha y desarrollan el velo (estructura de natación y alimentación), siendo capaces de alimentarse de pequeñas partículas que llegan con las corrientes de agua generadas por la hembra al interior de su cavidad. Este estadio de pediveliger con mancha ocular (pequeña mancha negra en el centro de la concha) señala la cercanía de la liberación larval.

Di-Salvo y col., (1983), señalan que la liberación larval ocurre en forma discontinua por más de 48 horas. La larva eclosionada con un tamaño aproximado de 0,5 mm., posee un período de vida planctónica muy corta que va entre 5 minutos a 24 horas. Los trabajos de Padilla y col. (1969) y de Solís (1973) demuestran que la fijación larval ocurre en el sustrato más cercano a la hembra que reúna las condiciones mínimas. También se describen tiempos que van de 2 horas a 18 días, estas diferencias con los otros autores se deberían, según Hollis (1963) y Cranfield y Michael (1989), a que el estado de vida planctónica de *Ostrea chilensis* podría ser breve, pero que al no encontrar un sustrato adecuado, la fijación se pospondría.

La fecundidad para esta especie ha sido cuantificada por muchos autores y con gran variabilidad en sus resultados. Según Lepez (1983), la fecundidad real va desde 3.500 hasta 152.000 embriones por hembra. Este mismo autor señala que estos valores deberían tener una asociación con el tamaño de los individuos, condición fisiológica de la hembra, lugar geográfico y características ambientales en el momento de los controles.

Las variables abióticas tales como: salinidad, temperatura, influyen directamente sobre la tasa de crecimiento y aspectos reproductivos. En cuanto a la salinidad se han encontrado especímenes viviendo en sectores donde las fluctuaciones de estos valores han alcanzado entre 6 a 34 partes por mil (Hancock, 1969; Padilla y col., 1969; Toro y Winter, 1983). Algunos estudios han revelado que esta especie se desarrolla en mejores condiciones en lugares con salinidades sobre 25 partes por mil (Chaparro y col., 1998), ya que valores muy bajos tienen influencia negativa sobre el proceso de alimentación. En el caso del estuario de Quempillén las temperaturas tienen un rango que van desde 9,2° C hasta 18,8°C y una salinidad de 28 hasta 33 partes por mil (Toro y col., 1995)

La información bibliográfica acerca de *Ostrea chilensis* es abundante sin embargo en lo referente a la biología reproductiva es incompleta y nos permite plantear la siguiente hipótesis:

Ostrea chilensis en el Estuario de Quempillén, presentaría una reproducción cíclica durante el año, la que se reflejaría en la histología gonadal, presentaría un hermafroditismo protándrico sucesivo y tendría una alta fecundidad potencial.

Puesto que el conocimiento del ciclo reproductivo de los invertebrados marinos es básico para su manejo y cultivo (Defeo, 1993). Además basándose en que el ciclo reproductivo se modifica según el ambiente se propone realizar un estudio que permita aumentar el conocimiento de los aspectos básicos de la reproducción de *Ostrea chilensis* en el estuario de Quempillén. Los objetivos del presente estudio son:

1. Caracterizar y determinar el ciclo gonadal de las células germinativas femeninas y masculinas de *Ostrea chilensis* a través de histología corriente.
2. Determinar a que talla de longitud de concha se inicia la maduración sexual y el tipo de sexualidad en *Ostrea chilensis*.
3. Establecer la fecundidad potencial de *Ostrea chilensis*, a través de la medición del volumen gonadal, determinación computacional y/o estereométrico en cortes histológicos (microscopía óptica) de la cantidad de ovocitos que existen en este volumen.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 AREA DE ESTUDIO.

El estudio se llevó a cabo utilizando especímenes provenientes del banco natural de *Ostrea chilensis*, ubicado en el estuario del Río Quempillén, en el norte de la Isla de Chiloé (41° 52' S; 73° 46' O). En este estuario el valor promedio anual de temperatura es de 14,7°C y de salinidad fluctúa entre 28 y 33 ‰ (Toro y col., 1995) respectivamente.

4.2 ANIMALES MUESTREADOS.

Para este trabajo se utilizaron mensualmente 30 individuos adultos de *Ostrea chilensis*, los que fueron colectados entre septiembre del 2000 hasta septiembre del 2001. Las Ostras seleccionadas fueron aquellas cuya longitud de concha fluctuó entre los 46 y 60 mm. Adicionalmente por una única vez se procesaron 24 ejemplares con una longitud que varió entre los 10 a 54 mm para determinar el cambio de sexo de esta especie.

4.3 ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA HISTOLOGICA GONADAL A LA MICROSCOPIA OPTICA.

El ciclo gonadal de *Ostrea chilensis* se determinó a través del análisis histológico de las muestras recolectadas mensualmente desde el banco natural del Estuario de Quempillén Ancud, Chiloé, durante el período que va desde septiembre del 2000 hasta septiembre del 2001.

Los ejemplares colectados de *Ostrea chilensis* fueron disecados y posteriormente se les extrajo una sección de 1 cm de grosor de la región medial de la gónada la que fue fijada en solución Davidson.

Los trozos de gónada se mantuvieron en fijador por un mínimo de 48 hrs para luego ser procesadas con técnica histológica corriente, según protocolo N° 1. Posteriormente se confeccionaron cortes de 7 µm con un micrótomo Spencer 820 (American Optical), los que fueron montados en portaobjetos y dejados en una estufa por 72 horas a 36°C, pasado este tiempo se procedió a la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

4.4 ANALISIS HISTOLOGICO.

Las preparaciones histológicas del tejido gonadal se observaron en un microscopio óptico Leyca DMLB-MPS60. Más tarde estas imágenes fueron capturadas y convertidas en una de señal de vídeo, por medio de una cámara digital (CE model. OS-70D). Esta imagen de vídeo fue digitalizada por medio de una tarjeta de vídeo Tune-in (ADS Technologies) y guardada como un archivo BMP, para luego ser convertidas a un archivo JPEG.

Para la estimación de los diámetros, área, eje mayor y eje menor de los ovocitos en diferentes estados de madurez gonadal, se utilizó el programa analizador de imágenes SIGMA SCAN PRO 5.0 (SPSS). Los diámetros de los ovocitos, se estandarizaron utilizando el FERET DIAMETER, del programa analizador de imágenes, el cual toma los valores del diámetro medido y aplica una fórmula matemática convirtiendo estos datos en un valor real que correspondería al diámetro que tendría una esfera perfecta. Para esto se tomaron diámetros de los ovocitos en diferentes estados de madurez gonadal.

4.5 FECUNDIDAD POTENCIAL Y REAL de *Ostrea chilensis*

4.5.1 Fecundidad Potencial

Para determinar este valor, se procedió a calcular el número de ovocitos por unidad de volumen utilizando la siguiente fórmula la que fue descrita por Williams (1981):

$$Nv = 4.664 \times \frac{(Na)^{3/2}}{D^4} \times \left(\frac{\sum_{i=1}^n (Di)^3}{n} \right)^{1/3}$$

Donde:

Nv = número de ovocitos por unidad de volumen.

Na = número de ovocitos por unidad de área.

D = media del diámetro de los ovocitos.

Di = diámetro de cada ovocito.

n = número de mediciones.

Se asume como unidad de área, el área de la gónada y como diámetro, el diámetro de los ovocitos observados.

Una vez obtenido el número de ovocitos por unidad de volumen, se procedió a calcular la fecundidad potencial o número total de ovocitos por individuo (F_p), según la fórmula:

$$F_p = N_v \times P$$

Donde:

F_p = fecundidad potencial o número total de ovocitos por individuo.

N_v = número de ovocitos por unidad de volumen.

V = promedio del volumen gonadal.

Para obtener el promedio del volumen gonadal (V), se extrajeron las gónadas de 20 individuos determinando su peso y el desplazamiento de líquido que provocaban al ser sumergidas en agua de mar, en una probeta graduada obteniendo así el volumen aproximado por cada gramo de gónada (un cm^3 correspondió a un gramo). El valor promedio del volumen gonadal utilizado para obtener los valores de fecundidad potencial fue de 2,3 grs (Tabla N° 4).

4.5.2 Fecundidad Real

Para obtener un valor de referencia de fecundidad real, se determinó el número de larvas a partir de una hembra incubatriz. Las larvas obtenidas fueron contadas utilizando el programa SIGMA SCAN PRO 5.0 (SPSS).

El total de larvas incubadas fueron colectadas en 20 ml de agua de mar, luego se calculó el número de larvas a partir de un 1 ml, posteriormente este valor se multiplicó por el volumen total (20 ml) estimando así el número total de larvas presentes en la hembra incubatriz.

4.6 ANALISIS ESTADISTICO

Se analizarán los meses con los cuales se obtuvo la fecundidad potencial de *Ostrea chilensis*, comparándolos mediante un análisis de varianza (ANOVA).

5. RESULTADOS

5.1 CICLO GONADAL DE *Ostrea chilensis*.

5.1.1 DESCRIPCION DE LOS TIPOS CELULARES GONADALES.

La gónada femenina se encuentra adosada al sistema digestivo. Histológicamente está organizada en numerosos folículos de diferente tamaño y forma, los que se abren a los ductos ubicados en la periferia del manto, estos a su vez confluyen a los gonoductos izquierdo y derecho desembocando en las cámaras suprabranquiales por medio de los poros genitales. Las paredes foliculares, ductos y gonoductos constan de un epitelio ciliar para facilitar la liberación de los gametos.

Los diámetros de los acinos foliculares y tipos de células que contienen varían de acuerdo al estado de madurez en que se encuentre la gónada, como sucede con el tejido conectivo el que disminuye a causa del mayor grado de madurez reproductiva de los individuos y aumenta en los individuos inmaduros.

En el interior de los acinos foliculares se observan las células germinales en diferentes estados de maduración las que pueden ser caracterizadas por su forma, tamaño y propiedades tintoriales.

El ovario se caracteriza histológicamente por los siguientes tipos celulares, los que pueden ser encontrados a lo largo de todo el año:

Ovogonias: Se encuentran adheridas a las paredes de los acinos foliculares. Presentan escaso contenido citoplasmático, su núcleo es esférico con ubicación central como se muestra en la Fig.1.

Ovocitos Inmaduros: Son de diferentes tamaños, con formas más elongadas que las ovogonias, los núcleos son ovalados y de mayor tamaño, alcanzando longitudes de hasta 70 μm , encontrándose cercanos a la pared del acino folicular, como se muestra en la Fig.2.

Células de Soporte: Se encuentran adheridas a las paredes foliculares, presentando un núcleo pequeño y alargado con escaso citoplasma Fig.2.

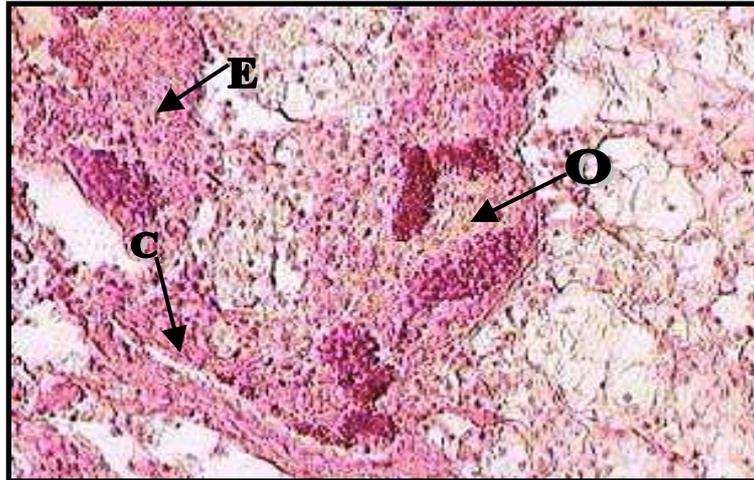


Fig.1. Corte transversal de gónada hermafrodita de *Ostrea chilensis* en diferenciación gonadal. C: conducto; E: espermatogonias; O: ovogonias. Tinción H-E. (200x).

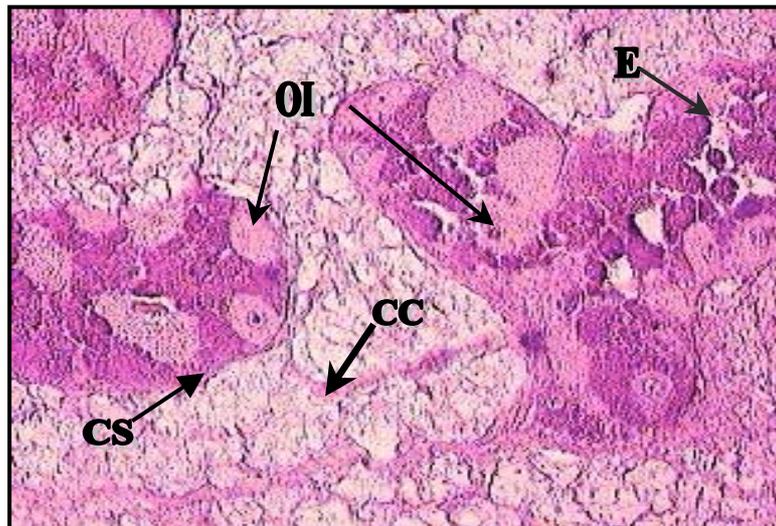


Fig.2. Corte transversal de gónada hermafrodita de *Ostrea chilensis* en Madurez inicial. CC: conducto cerrado; CS: células de soporte; E: espermatozoides; OI: ovocitos inmaduros. Tinción H-E. (200x).

Ovocitos Previtelogénicos: Células de gran tamaño, la cual varía de acuerdo a la cantidad de vitelo acumulado en forma de plaquetas vitelinas con marcada eosinofilia en su citoplasma. Su núcleo es ovalado algo mas grande y con nucleolos. Fig.3.

Ovocitos Maduros: Estos son de gran tamaño, el núcleo es de mayor tamaño que el ovocito Previtelogénico, tiene ubicación excéntrica sin tomar contacto con la pared del citoplasma. El ovocito ocupa el lumen folicular y su citoplasma esta lleno de plaquetas vitelinas, al estar en madurez máxima estas se desprenden de la pared folicular adquiriendo una forma ovoide. Fig.3.

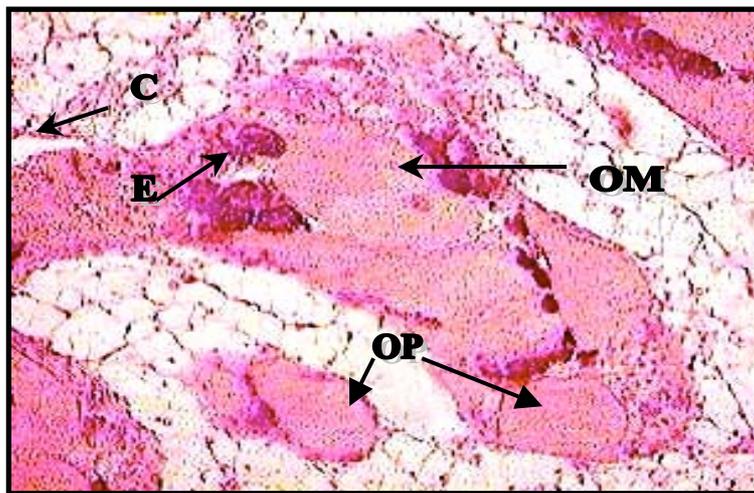


Fig.3. Corte transversal de gónada hermafrodita de *Ostrea chilensis* en diferentes estados de madurez. C: conducto; E: espermatozoides; OM: ovocitos maduros; OP: ovocitos previtelogénicos. Tinción H-E (200x).

5.1.2 GAMETOGENESIS

Al observar los cortes histológicos a la microscopía óptica de *Ostrea chilensis* se pudo observar que los eventos de multiplicación, crecimiento y madurez de las células germinales no ocurren al mismo tiempo, apareciendo células indiferenciadas en las cercanías de las paredes de los acinos foliculares, encontrándose estas características en folículos con células en estados de madurez máxima.

5.1.3 TIPO DE SEXUALIDAD

Como se muestra en la Tabla 2, los ejemplares de *Ostrea chilensis*, presentaron un alto porcentaje de hermafroditismo, encontrándose en el mismo acino folicular tejido gonadal femenino y masculino (Fig.4), con un 51,9%. La frecuencia porcentual de los individuos con tejido gonadal masculino fue de un 46,9% y con tejido gonadal femenino sólo un 1,2%.

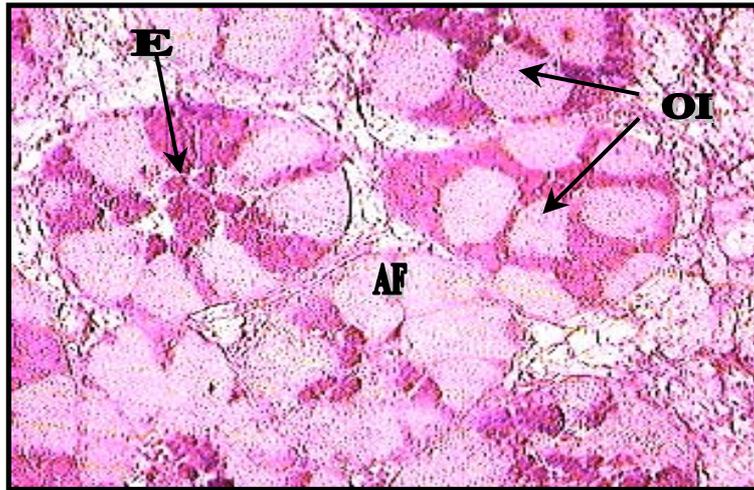


Fig.4. Corte transversal de gónada hermafrodita de *Ostrea chilensis* en diferentes estados de inmadurez. **E**: espermatozoides en diferente estado de espermiogénesis; **OI**: ovocitos inmaduros; **AF**: acino folicular. Tinción H-E (200x).

5.2 ANALISIS HISTOLOGICO PARA DETERMINAR CAMBIO DE SEXUALIDAD

El análisis histológico de la serie adicional para determinar el cambio de sexualidad de *Ostrea chilensis*, mostró que los individuos con tallas inferiores a 2 cms de longitud de concha no exhiben tejido gonadal estando en etapa de inmadurez, observándose solamente glándula digestiva. En tallas superiores se encontraron acinos foliculares sólo con células germinales masculinas en diferentes estados de espermatogénesis. Además se observó que entre tallas de 3,5 a 4,0 cms de longitud de la concha se encontraron individuos con tejido gonadal femenino y masculino en los acinos foliculares.

5.3 CICLO GONADAL DE *Ostrea chilensis*

Para determinar el ciclo gonadal se definieron los diferentes estados de maduración gonadal tomando como referencia la clasificación de Gleisner (1981), dividiendo el ciclo gonadal de *Ostrea chilensis* en los siguientes 6 estados gonadales:

Inmadura: En este estado se observa escaso desarrollo de los acinos foliculares con escaso contenido de células germinales y alto contenido de tejido conectivo interfolicular. Fig.5.

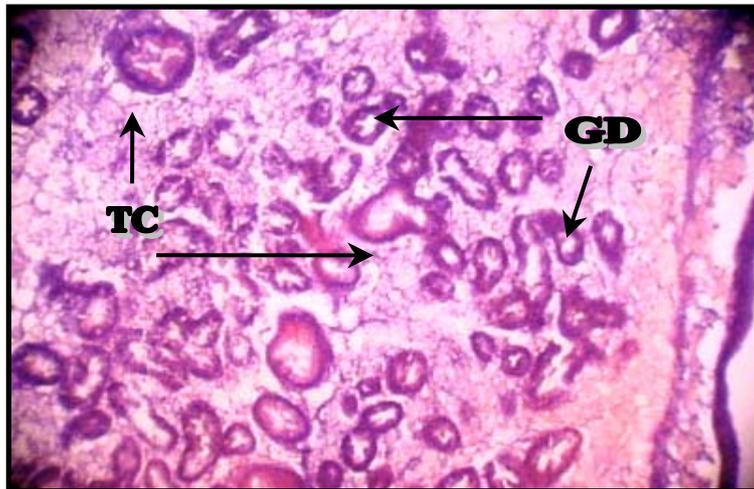


Fig.5. Corte transversal de gónada indiferenciada *Ostrea chilensis* en estado de inmadurez. **GD**: glándula digestiva; **TC**: tejido conectivo. Tinción H-E (100x).

Madurez Inicial: En este estado encontramos una gónada con los acinos foliculares de tamaño variable que en su interior podemos encontrar espermatozoides en diferentes etapas de espermatogénesis y ovogonias hasta ovocitos previtelogénicos. Fig.6.

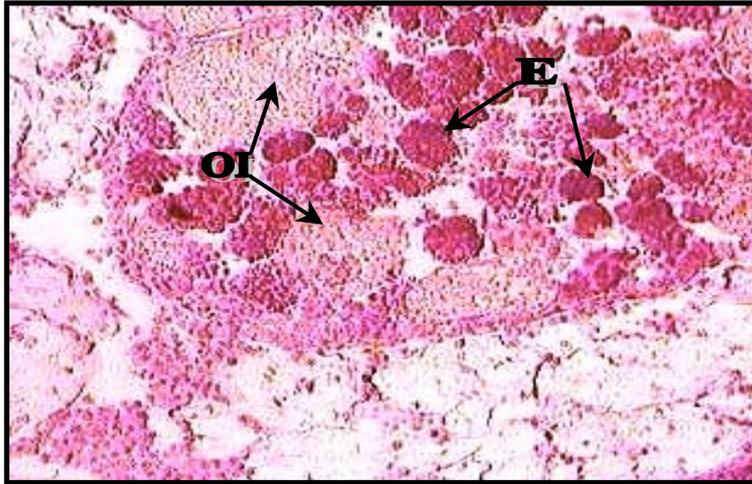


Fig.6. Corte transversal de gónada hermafrodita de *Ostrea chilensis* en estado de inmadurez. **EI**: espermatozoides en diferente estado de espermiogénesis; **OI**: ovocitos inmaduros. Tinción H-E (200x).

Madurez Máxima: En este estado los acinos foliculares se encuentran totalmente completos de ovocitos vitelógenicos o espermatozoides maduros, aquí encontramos el tejido conectivo interfolicular disminuido. Fig.7.1 y 7.2.

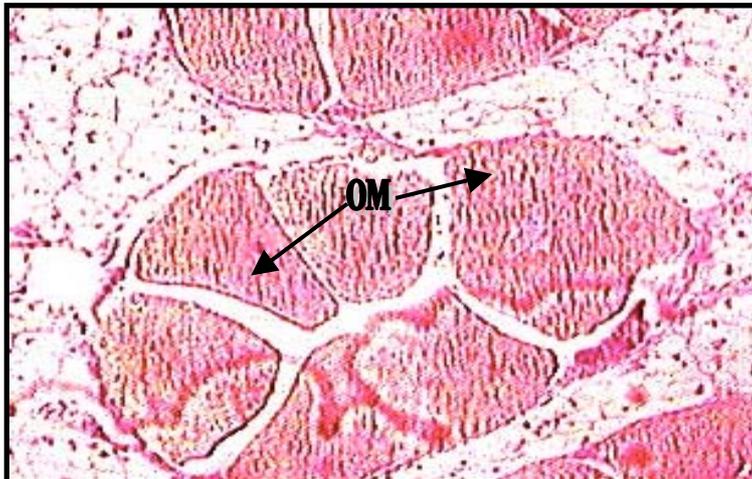


Fig.7.1. Corte transversal de gónada de hembra de *Ostrea chilensis* en estado de madurez; **OM**: ovocitos maduros. Tinción H-E (200x).

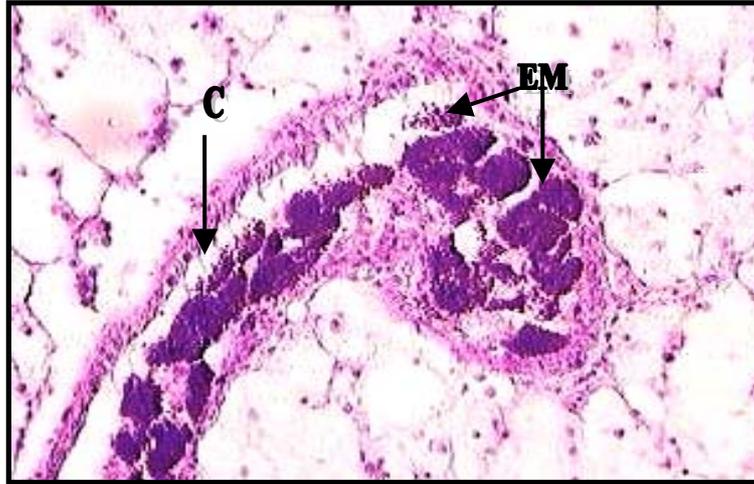


Fig.7.2. Corte transversal de gónada de macho de *Ostrea chilensis* en madurez máxima. EM: espermatozoides maduros. Tinción H-E (200x).

Emisión: Los acinos foliculares presentan ovocitos o espermatozoides en madurez máxima, los conductos se observan abiertos y con gametos siendo liberados al interior de estos conductos como se observa en la Fig.8.1 y 8.2.

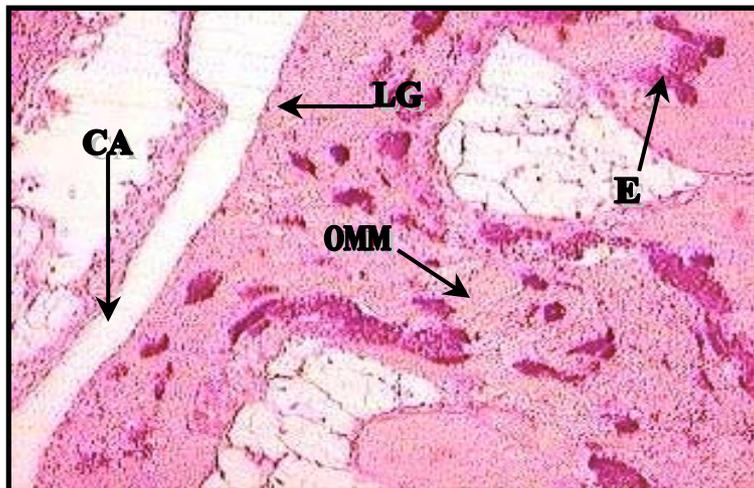


Fig.8.1. Corte transversal de gónada hermafrodita de *Ostrea chilensis* en madurez máxima y emisión de gametos. CA: conducto abiertos; E: espermatozoides; LG: liberación de gametos; OMM: ovocitos maduros. Tinción H-E (200x).

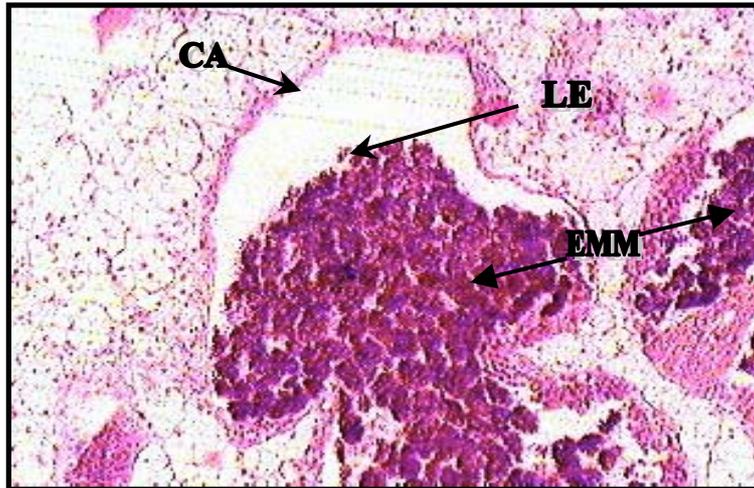


Fig.8.2. Corte transversal de gónada masculina de *Ostrea chilensis* en liberación de espermatozoides en madurez máxima. CA: conductos abiertos; LE: liberación de espermatozoides E: espermatozoides en madurez máxima. Tinción H-E (200x).

Regresión: Es la etapa de recuperación de la gónada y el inicio de la gametogénesis, los acinos foliculares se encuentran reducidos con restos de células germinales como se muestra en la Fig.9.

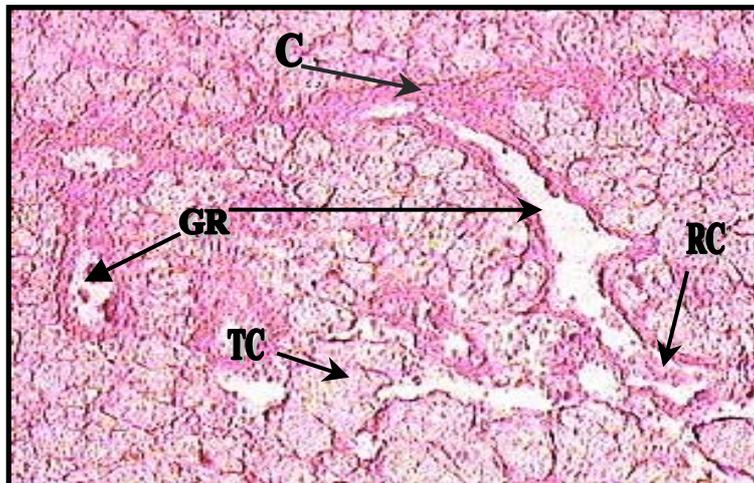


Fig.9. Corte transversal de gónada en regresión de *Ostrea chilensis*. C: conducto; RC: restos celulares; TC: tejido conectivo; GR: gónada en regresión. Tinción H-E (200x).

Los resultados obtenidos del análisis histológico de los individuos observados mensualmente muestran:

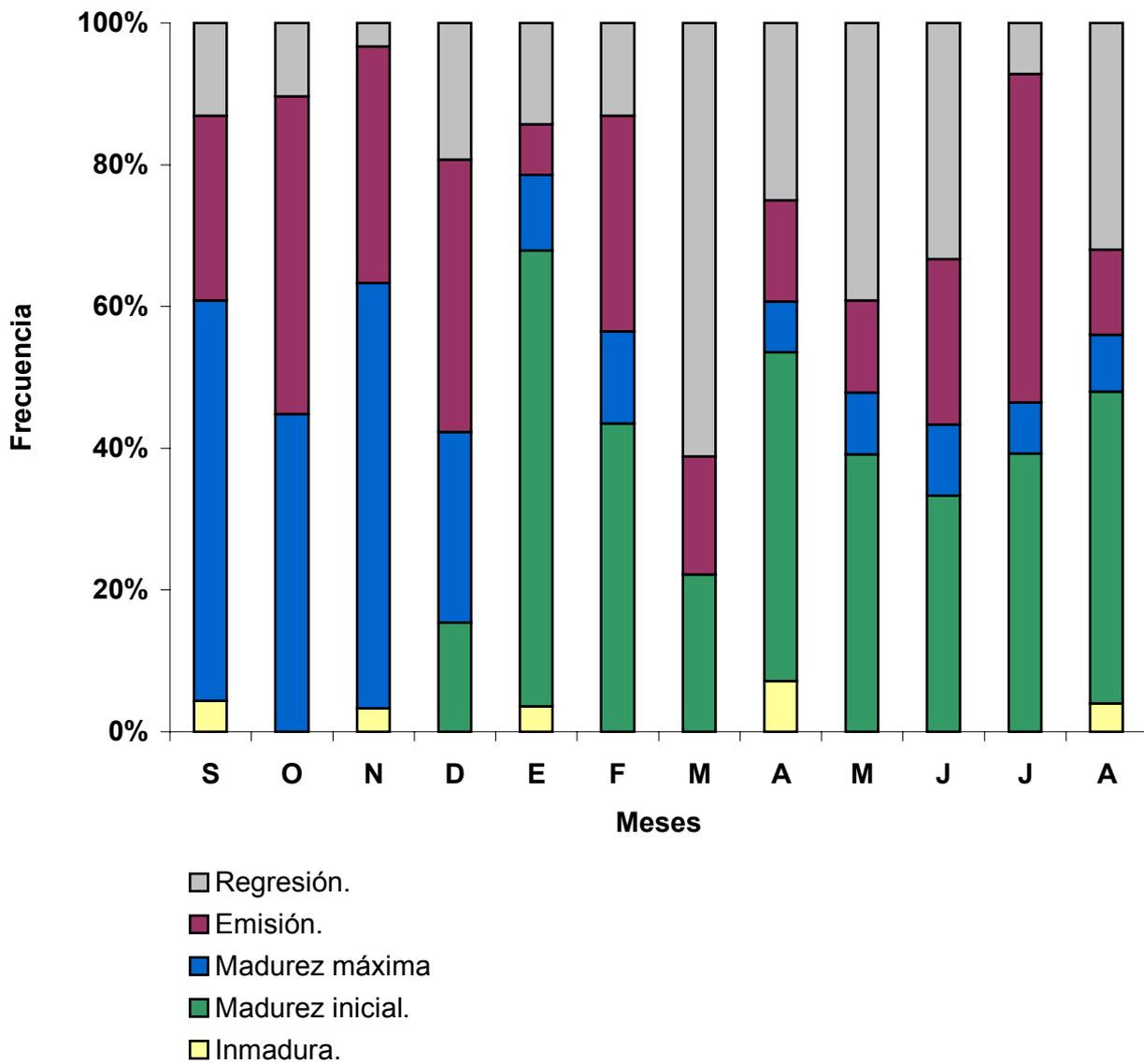
Estados de inmadurez: Durante los meses de septiembre y noviembre del 2000, enero, abril y agosto del 2001 se obtuvieron en porcentajes bajos los que fluctuaron entre un 3% a 7% en los otros meses no se detectaron individuos en este estado (Tabla N° 3 y Gráfico N° 1).

Estado de madurez inicial: Este estado fluctuó entre un 15,3% en diciembre del 2000 y un 46,4% en abril del 2001. En cambio los primeros meses muestreados durante el año 2000 (septiembre, octubre y noviembre), no se observan individuos con este tipo de células dentro de los acinos foliculares (Tabla N° 3 y Gráfico N° 1).

Estado de madurez máxima: Los resultados fueron más significativos ya que se nota una marcada estacionalidad, siendo los meses de septiembre a diciembre del 2000 los porcentajes más altos que van desde un 26% hasta un 60% de individuos con su gónada en madurez máxima. No obstante en los otros meses de estudio también encontramos individuos con madurez máxima pero con un menor porcentaje y en dos meses no se observa individuos en este estado (Tabla N° 3 y Gráfico N° 1).

Estado de emisión de gametos: Los individuos en estado de emisión de gametos se observaron a largo de todo el período de estudio, fluctuando sus frecuencia de un 7,1% a un 46,4%, altos valores se encontraron entre en los meses de septiembre a diciembre del 2000 y julio del 2001(Tabla N° 3 y Gráfico N° 1).

Estado de regresión: Los individuos en estado de regresión se observaron a lo largo de todo el período en estudio, fluctuando sus frecuencia de un 3,3% a 61,1%. Los valores más altos se encontraron en los meses de marzo a junio del 2001 (Tabla N° 3 y Gráfico N° 1).



individuos en madurez máxima y en emisión (sobre un 25%), mientras que el estadio de regresión se presentó en bajas frecuencias (bajo un 20%), en esta estación no se observaron individuos en estado de madurez inicial.

En verano se destaca el comienzo del estado de madurez inicial llegando a su máximo en enero del 2001 (64%). Además se observó una disminución de la frecuencia del estado de madurez máxima, no encontrando individuos en este estadio al final de verano (marzo 2001).

En otoño e invierno del año 2001 se destacan las altas frecuencias de individuos en madurez inicial (sobre un 30%), en el estado de madurez máxima encontramos bajos valores (bajo un 10%). También se encontraron bajos valores a excepción del mes de julio del 2001 (46,4%), en cuanto a la frecuencia de individuos en estado de regresión se observaron valores altos (sobre un 25%) a excepción del mes de julio del 2001 (7,1%).

Individuos en estado de inmadurez no se observaron en la mayoría de los meses del estudio, presentando frecuencias muy bajas (menor al 8%) en los meses de septiembre y diciembre del año 2000 y marzo y agosto del año 2001.

5.4 FECUNDIDAD POTENCIAL Y REAL DE *Ostrea chilensis*

El promedio mensual de fecundidad potencial de *Ostrea chilensis* entre septiembre y diciembre del año 2000, fluctuó entre 5.215 y 217.255 ovocitos por individuo (Tabla N° 1 y Tabla N° 5).

En cuanto al valor promedio de fecundidad real, se determinó que en el mes de octubre del año 2002 fue de 180.000 larvas por individuo.

Tabla N° 1. Promedio mensual de la fecundidad potencial de *Ostrea chilensis* en el estuario de Quempillén, entre septiembre y diciembre del año 2000.

Meses	Fecundidad Potencial
Septiembre	217.256
Octubre	5.215
Noviembre	14.679
Diciembre	102.561

5.5 TAMAÑO DE LOS OVOCITOS

Los resultados obtenidos de 102 mediciones de ovocitos de *Ostrea chilensis* durante los meses en estudio indicaron que el tamaño de los ovocitos fluctuó entre 160 a 205 μm , con un promedio de 175 μm (Tabla N° 6).

5.6 ANALISIS ESTADISTICO

Se analizaron los resultados de los meses con los cuales se obtuvo la fecundidad potencial de *Ostrea chilensis*, comparándolos mediante un análisis de varianza (ANOVA), no encontrando diferencias significativas entre ellas.

6. DISCUSION

La madurez sexual en *Ostrea chilensis* es un evento complejo ya que en ella influyen muchos factores tales como: temperatura, salinidad y especialmente la disponibilidad de alimentos (Loosanoff, 1963).

Muchos estudios han demostrado el rol que juegan las reservas energéticas en los procesos de gametogénesis en otras especies de "Ostras" (Coe, 1932; Bargeton-Couteaux; 1942; 1965; Kennedy y Battle, 1964).

Gleisner (1981) menciona que durante el primer año, la energía se utilizaría para el crecimiento del individuo mientras que el segundo año de vida se dispondría de un aporte de energía para la maduración de la gónada. Este mismo autor señala que el primer sexo funcional de esta especie sería el macho y que a partir del tercer año de vida comenzaría la ovogénesis. Para las restantes especies del género *Ostrea* se describe una secuencia similar de maduración sexual (Stafford, 1913; Spärck, 1925; Coe, 1932).

El análisis histológico realizado en este estudio demostró resultados similares a los obtenidos por Gleisner (1981) ya que el primer sexo funcional observado para la especie de *Ostrea chilensis* es el macho en tallas superiores a 2 cms de longitud de concha, ya que el proceso de maduración de los ovocitos demandaría un período mas largo y de mayor requerimiento energético que la maduración de los espermatozoides. En tallas sobre los 3,5 cms se evidencia tejido gonadal femenino iniciándose así la ovogénesis, para encontrar ovocitos maduros en tallas comerciales, es decir sobre 4,5 cms.

Gleisner (1981) señala que la maduración de los ovocitos demandaría alrededor de dos años y la maduración espermática ocurre activamente en un período de 6 meses. Esta diferencia de tiempo y energía requerida para la gametogénesis, coincide con observaciones en el género *Ostrea* (Spärck, 1925; Orton, 1927, 1933; Coe, 1932).

Diferentes estudios se han realizado acerca del ciclo gonadal en bivalvos, discutiendo aspectos de la gametogénesis, los tipos celulares y los estados del ciclo gonadal (Eversole y col., 1980; Kautsky, 1982; Lowe y col., 1982; Vélez y Epifanio, 1981; Beauchamp, 1986). Las investigaciones realizadas en el género *Ostrea* han sido realizadas para describir aspectos tales como la alternancia de sexos, los estados gonadales y las fases larvales (Coe, 1931; Loosanoff, 1962; Mann, 1979; Wilson y Simons, 1985; Morriconi y Calvo, 1979). En el caso de *Ostrea chilensis*, Gleisner (1981) describió el ciclo gonadal mediante un análisis histológico, dividiendo el ciclo gonadal en 26 estados. El presente estudio en cambio se basó en los

análisis histológicos de las células encontradas al interior de los acinos foliculares a lo largo de año de muestreo definiendo solamente 6 estados de maduración.

Gleisner (1981) describe a *Ostrea chilensis* como hermafrodita potencial, ya que este autor postula que sólo habrían machos funcionales, a pesar de encontrarse dentro de los acinos foliculares ovocitos vitelogénicos con diámetros de 170 μm , se encontrarían en estado de latencia para constituirse en hembras maduras hasta la próxima estación reproductiva, este autor también describe fagocitosis y reabsorción de espermatozoides en individuos hermafroditas, con lo cual se produciría el cambio de sexualidad de macho a hembra funcional aumentando así el número hembras con posibilidad de emitir ovocitos maduros.

Matus (1995), obtuvo en su estudio un 30% de individuos hermafroditas. Por otra parte las hembras maduras representaron un 15 %, en tanto que el 55 % correspondió a machos. Este autor consideró con la posibilidad de desovar a la población de hembras maduras y a los individuos hermafroditas, encontrando en su estudio que el 40 % de hembras en la estación reproductiva estaban incubando.

En este estudio se obtuvieron un alto porcentaje de individuos hermafroditas (51,9 %), un 46,9 % de los individuos resultaron ser machos y encontrándose un 1,2 % de hembras, esta diferencia se pueden deber a que en este estudio se consideró un individuo hermafrodita independiente de la proporción de los gametos masculinos o femeninos contenidos en los acinos foliculares. En cuanto al rol que tendrían los individuos hermafroditas en la época reproductiva, éstos participan activamente en la producción de ovocitos alcanzando estados de madurez máxima, tanto los gametos femeninos como los masculinos. Concordando con los resultados entregados por Matus (1995). No así con el trabajo de Gleisner (1981), el cual señala que *Ostrea chilensis* no funcionaría consecutivamente como hembras y machos en una misma estación reproductiva.

En cuanto a la energía que necesitarían estos individuos hermafroditas en desarrollar ambas líneas gametogénicas, estos deben dividir la energía disponible para la reproducción, tanto en la formación de ovocitos como de los espermatozoides (Matus, 1995). Heath (1977) sugiere que la energía destinada a la reproducción, se ve afectada en el caso de individuos hermafroditas, provocando una disminución en la producción de gametos de un sexo, atribuyéndola a la inversión paralela de energía en la generación de estructuras reproductivas del otro sexo. En los bivalvos las únicas estructuras reproductivas son las gónadas en las que se forman los gametos, por lo cual en individuos hermafroditas, la cantidad de energía destinada a la reproducción debe dividirse en ambas líneas gametogénicas, entonces la energía va a ser menor en comparación a un individuo que produce un solo tipo de gametos.

Coe (1943) clasificó los tipos de hermafroditismo observados en bivalvos, proponiendo para las especies del género *Ostrea* una sexualidad consecutiva rítmica, caracterizada por una

alternancia regular de sexos en un mismo individuo, pudiendo ocurrir los cambios de sexos en periodos más cortos. Andrews (1979) sugiere que los factores como temperatura y la disponibilidad del alimento podrían influenciar estos cambios.

En cuanto al tamaño de los ovocitos, Andrews (1979) señala que las especies del género *Ostrea* tiene ovocitos de “medianos a grandes”. Morriconi y Calvo (1979) describen para *Ostrea puelchana* ovocitos con diámetros que fluctúan entre 60 a 90 μm , con períodos de maduración gonadal corto y una estación reproductiva más larga (octubre a marzo). Para la especie de *Crassostrea gigas* se describen ovocitos con un tamaño promedio de 50 μm (Quayle, 1969). *Ostrea chilensis*, en cambio posee 220 μm (Solís, 1967) el mayor diámetro de los ovocitos para el género de *Ostrea* lo que pudiera influir en un mayor tiempo que se alcanzaría la maduración del ovocito, pudiendo tomar hasta dos temporadas (Gleisner, 1981).

Solís (1967) describe para la especie de *Ostrea chilensis* tamaños que fluctúan entre un diámetro de 220 a 268 μm . Gleisner (1981) menciona rangos que van desde 230 a 268 μm con un promedio de 250 μm , Walne (1963) y Ramorino (1970) encontraron diámetros de 264 y 323 μm respectivamente. Matus (1995) encontró tamaños para hembras puras de 205 a 240 μm e individuos hermafroditas ovocitos con diámetros que oscilan entre 180 a 210 μm .

El promedio de los ovocitos de *Ostrea chilensis* es 205 μm , siendo estas medidas diferentes a los reportados por otros autores. Esta diferencia en el tamaño de los ovocitos se podría explicar por las diferentes técnicas usadas para la medición. O en caso contrario que al momento de la medición estos hayan alcanzado la madurez máxima semanas después.

Respecto de la fecundidad existen varios estudios en bivalvos que relacionan este parámetro biológico con el tamaño de los padres (Asson-Batres, 1988; Beauchamp, 1986; O’Foighil, 1989; Gallardo, 1993; Kautsky, 1982; Richardson, 1979; Russell y Huelsenbeck, 1989). Mackie (1984), menciona que los bivalvos que expulsan sus gametos al medio externo, producen un alto número de huevos de pequeño tamaño (menos de 60 μm de diámetro) y especies con un desarrollo directo, producirían una menor cantidad de huevos pero estos serían de mayor tamaño.

En el género *Ostrea*, también existen estudios sobre fecundidad (Walne, 1963, 1964, 1979; Cranfield y Allen, 1977; O’Sullivan, 1980; Morriconi y Calvo, 1980), los que describen la relación que existe entre el número de larva incubadas por individuo y el tamaño que presenta ostra incubatriz, destacando una alta variación entre individuos de una misma población y con tamaños similares.

Para el caso de *Crassostrea gigas* (Quayle, 1969), cuyo tamaño fluctúa entre 8 a 30 cms de longitud de la concha, indican que el número de ovocitos que produce esta especie ha

sido estimada entre 50 a 100 millones por estación reproductiva. Para *Ostrea edulis* la estimación de su fecundidad va desde 500.000 a 1 millón de ovocitos, con un tamaño adulto de 10 cms de longitud de la concha.

En *Ostrea chilensis* Lepez (1983) encontró una fecundidad real de embriones o larvas incubadas por individuos de una misma población que va desde 3.500 a 152.125. En cambio Gleisner (1981) señala para la especie una fecundidad relativamente baja la cual en promedio es de 38.600 huevos. Matus (1995) en su estudio encontró valores que van entre los 3.200 a 113.000, con un promedio de 58.000 embriones, siendo este promedio dependiente del tamaño de las hembras incubatrices

Respecto de la fecundidad existen varios estudios en bivalvos que relacionan este parámetro biológico con el tamaño de los padres (Asson-Batres, 1988; Beauchamp, 1986; O'Foighil, 1989; Gallardo, 1993; Kautsky, 1982; Richardson, 1979; Russell y Huelsenbeck, 1989). Mackie (1984), menciona que los bivalvos que expulsan sus gametos al medio externo, producen un alto número de huevos de pequeño tamaño (menos de 60 μm de diámetro) y especies con un desarrollo directo, producirían una menor cantidad de huevos pero estos serían de mayor tamaño.

En el género *Ostrea*, también existen estudios sobre fecundidad (Walne, 1963, 1964, 1979; Cranfield y Allen, 1977; O'Sullivan, 1980; Morriconi y Calvo, 1980), los que describen la relación que existe entre el número de larva incubadas por individuo y el tamaño que presenta ostra incubatriz, destacando una alta variación entre individuos de una misma población y con tamaños similares.

Para el caso de *Crassostrea gigas* (Quayle, 1969), cuyo tamaño fluctúa entre 8 a 30 cms de longitud de la concha, indican que el número de ovocitos que produce esta especie ha sido estimada entre 50 a 100 millones por estación reproductiva. Para *Ostrea edulis* la estimación de su fecundidad va desde 500.000 a 1 millón de ovocitos, con un tamaño adulto de 10 cms de longitud de la concha.

En *Ostrea chilensis* Lepez (1983) encontró una fecundidad real de embriones o larvas incubadas por individuos de una misma población que va desde 3.500 a 152.125. En cambio Gleisner (1981) señala para la especie una fecundidad relativamente baja la cual en promedio es de 38.600 huevos. Matus (1995) en su estudio encontró valores que van entre los 3.200 a 113.000, con un promedio de 58.000 embriones, siendo este promedio dependiente del tamaño de las hembras incubatrices

En este estudio se obtuvo la fecundidad potencial para la especie de *Ostrea chilensis* los cuales van de 5.215 hasta 217.256 ovocitos por individuo lo cual no implica que todos los

ovocitos sean liberados en la misma época reproductiva. Si comparamos los valores de fecundidad potencial encontrados con las demás especies, *Ostrea chilensis* se encuentra con valores muy inferiores, teniendo influencia en ello los tamaños de los ovocitos y además el tamaño de la especie alcanzando tamaños de hasta 6 cms de longitud. En cuanto a la fecundidad real se encontraron valores mas altos lo que se puede deber a las técnicas utilizadas con programas computacionales en que el error es mucho menor que los utilizados en otros estudios.

La reproducción en los invertebrados marinos es un proceso fisiológico cíclico, dónde la periodicidad se relaciona con las condiciones acuáticas las que están reguladas por el lugar geográfico en donde se encuentra la especie. Muchas de las especies que habitan zonas climáticas templadas, exhiben un ciclo reproductivo anual (Giese, 1959). Las poblaciones inician y regulan el desarrollo gonadal hasta su maduración, en coordinación con los cambios del ambiente a lo largo de las diferentes estaciones del año, siendo las variaciones estacionales de la temperatura y el fotoperíodo los factores que influyen notoriamente en el ciclo reproductivo (Loosanoff y Davis, 1952., Barnes, 1963., Sastry, 1966,1970., Bayne, 1976). Sin embargo la productividad primaria y los cambios en la producción del fitoplancton también implican que muchos bivalvos filtradores deben adecuar su ciclo reproductivo a estas ofertas. Estudios de Thorson, (1950) y Bayne, (1976) demuestran que en zonas templadas muchas especies sincronizan la eclosión de sus larvas con el período del año en que el alimento planctónico es más abundante.

Bayne (1975) señala que los procesos más directamente sometidos a la regulación climática de las aguas, son los que conforman las distintas etapas del ciclo gametogénico: el inicio de la gametogénesis, la fase de multiplicación de los espermatoцитos y el crecimiento de los ovocitos, incluyendo la vitelogénesis en las hembras, la maduración fisiológica de los gametos y su evacuación.

Una vez que se inicia la gametogénesis, la fase de crecimiento ocurrirá dependiendo de la temperatura de las aguas, actuando como sincronizador de los ritmos estacionales de este proceso. Por otra parte, la producción de gametos demanda un importante gasto de energía para el animal, por lo tanto, debe existir un aporte de nutrientes ya sea como oferta alimenticia o como reserva en los tejidos.

Las especies del género *Ostrea* concentran tanto la liberación de gametos como la incubación de los embriones en ciertas estaciones del año, sin embargo la extensión de la estación reproductiva varía de acuerdo a las condiciones de la temperatura de los lugares geográficos en que habitan (Stafford, 1913., Loosanoff, 1963). Andrews (1979) menciona que para el género *Ostrea* las temperaturas promedio para la estación reproductiva fluctúan entre los 15° a 20° C, mientras que para el género “*Crassostrea*” las temperaturas van desde 20° a 25°

C. En el caso del estuario de Quempillén las temperaturas fluctuarían entre un rango de 9° C a 18,8° C (Toro y col., 1995).

Varios estudios señalan que el ciclo reproductivo de *Ostrea chilensis* seguiría paralelamente al ciclo de temperatura anual de las aguas (Gleisner, 1981., Tomicic y Bariles, 1981., Lepez, 1983., Winter y col., 1983., Chaparro, 1985). Las alzas de temperatura en la naturaleza ocurren en la época de primavera-verano, lo que hace presumir que el proceso de desove se produciría en estos meses, lo que ha sido ratificado en estudios realizados en Quempillén (Winter y col., 1983., Chaparro, 1985., Chaparro y col, 1988, Winter y col., 1988).

Gleisner (1981) señala que la liberación de gametos comienza durante el alza de temperatura primaveral, en cambio la eclosión larval ocurre cuando las temperaturas alcanzan su máximo anual. Solís (1967) y Padilla y col (1969) reportan para otros sectores tales como Pullinque y Apiao respectivamente, encuentran para *Ostrea chilensis* desoves y fecundación a inicio de primavera (septiembre) y con un rango de temperatura menor (10° a 11° C), además de encontrar nuevas emisiones de gametos en los meses de verano ya que se encontraron individuos incubando larvas terminales a comienzo de otoño.

Este estudio se demostró que *Ostrea chilensis* muestra un patrón reproductivo del género al cual pertenece ya que al igual que resultados encontrados por otros autores, esta especie seguiría un ciclo anual relacionado con el aumento de la temperatura y oferta alimenticia, ya que los meses con mayor porcentaje tanto de maduración y emisión de gametos se observan en los meses de primavera-verano, aunque a lo largo de todo el año podemos encontrar individuos en este estado, lo que se puede deber a fluctuaciones en la temperatura a lo largo del año. En invierno la gónada se encuentra con gametos en estado de inmadurez deteniendo el crecimiento de sus gametos ya que la demanda de energía para estos procesos no es suficiente, destinándola su mantención y crecimiento.

7. CONCLUSIONES

- El ciclo reproductivo presenta una marcada estacionalidad.
- *Ostrea chilensis* es un hermafrodita protándrico puesto que primero madura como macho en tallas menores a 30 mm de longitud de la concha (2 año de edad). Mientras que en tallas superiores los individuos exhiben gónada femenina en forma alternante con la gónada masculina.
- La gónada de *Ostrea chilensis* presenta, dentro de un mismo acino folicular maduración simultánea, emitiendo al mismo tiempo gametos de ambos sexos, teniendo por lo tanto un comportamiento de hermafrodita simultáneo.
- Al ser *Ostrea chilensis* un hermafrodita simultáneo se plantea la posibilidad de que exista autofecundación.
- Los valores de fecundidad potencial de *Ostrea chilensis* en la estación reproductiva varía entre 5.215 y 217.255 ovocitos por individuo.
- El tamaño de los ovocitos va desde 160 a 205 μm de diámetro y el promedio de los ovocitos de *Ostrea chilensis* es de 175 μm .

8. BIBLIOGRAFIA

- ASSON-BATRES, M. A. 1988. Reproduction and growth of the brooding bivalve *Transennella tantilla*. Veliger 30 (3): 257-266.
- ANDREW, J. D. 1979. Pelecypoda: Ostreidae. En : A. C. Giese y Y.S. Pearse. "Reproduction of Marine Invertebrates". Vol. 5. Nueva York. Academic Press.
- BARGETON-COUTEAUX, M. 1942. Les variations saisonnieres du tissu conjonctif vesciculeux chez l'huitre. Bull. Biol. Fr. Belg. 76 (2): 175-191.
- BARNES, H. 1963. Light, temperature and breeding of *Balanus balanoides*. Journ. Mar. Biol. Assoc. U. K. 43: 717-728.
- BAYNE, B. L. 1975. Aspects of reproduction in bivalve mollusc. En: M. Wiley. "Estuarine Processes. Uses, Stress and Adaptation to the Estuary". Vol I. Londres. Academic Press.
- BAYNE, B. L. 1976. Reproduction in bivalve mollusc under environmental stress. En: F. J. Vernberg. "Physiological Ecology of Estuarine Organisms" Columbia, South Carolina. University of South Carolina Press.
- BEAUCHAMP, K. A. 1986. Reproductive ecology of the brooding, hermaphroditic clam *Lasaea subviridis*. Mar. Biol. 93: 225-235.
- CHAPARRO, O. R. 1985. Estudios biológicos para el manejo de la fijación larval de *Ostrea Chilensis*. V Jornadas Ciencias del Mar. Coquimbo. 58 pp.
- CHAPARRO, O. R., J. E. TORO., J. E. WINTER. 1988. Biología y cultivo de *Ostrea chilensis* en el estuario del Río Quempillén (Chiloé, Sur de Chile). VI Symposio Latinam. Acuicult. Florianópolis, Brasil.
- CHAPARRO, O. R., J. E. TORO. 1989. Conocimientos biológicos de *Ostrea chilensis*, Phillipi 1845, Impacto y perspectiva en el Desarrollo de la ostricultura chilena en "Cultivos de Moluscos en América Latina". 4: 231-264.
- CHAPARRO, O. R., BAHAMONDEZ, I., LARDIES, M. A. 1998. Cultivos de la Ostra Chilena (*Ostrea chilensis*).
- COE, W. R. 1931. Spermatogenesis in the California oyster (*Ostrea lurida*). Biol. Bull. 61: 309-315.

- HICKMAN, C. P., ROBERTS, L. S., PARSON, A. 1998. Moluscos en “Principios Integrales de Zoología”. 17: 324-353.
- HOLLIS, P.J. 1963 Some studies on the New Zealand oysters. Zool. Publ. Victoria Univ. Wellington. 31: 1-28.
- IVERSEN, E. S. 1982. *Ostrea chilensis* en “Cultivos Marinos”. 7: 133-156.
- KAUTSKY, N. 1982. Quantitative studies on gonad cycle, fecundity, reproductive output and recruitment in a Baltic *Mytilus edulis* population. Mar. Biol. 68: 143-160.
- KENNEDY, A. V., H.I. BATTLE. 1964. Cyclic changes in the gonad of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 42 (2): 305-321.
- LOWE, D. M., M. N. MOORE and B. L. BAYNE. 1982. Aspect of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 62: 133-145.
- LEPEZ, M. I. 1983. El cultivo de *Ostrea chilensis* en la zona Central y Sur de Chile. Mems. Asoc. Latinoam. Acuicult. 5 (2): 117-127.
- LOOSANOFF, V. L., H. C. DAVIS. 1952. Temperature requirements for maturation of northern oyster. Biol. Bull. 103(1): 80-96.
- LOOSANOFF, V. L. 1962. Gametogenesis and spawning of the European oyster *Ostrea edulis*, in waters of Maine. Biol. Bull. 122 (1): 86-89.
- LOOSANOFF, V. L. 1963. Gametogenesis and spawning of the European oyster, *Ostrea edulis*, in water of Maine. Biol. Bull 122 (1): 86-94.
- LOOSANOFF, V. L. 1965. Gonad development and discharge of spawn in oyster of Long Island Sound. Biol. Bull. 122 (3): 546-561.
- MACKIE, G. L. 1984. Bivalves. 351-418. In: Tompa, A. S., N. H. VERDOK y J. VAN DEN BIGGERLAAR, (eds). The Mollusca. Vol. 7. reproduction. Academic Press, Inc. 486 pp.
- MANN, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 59: 95-110.
- MATUS, P. 1995. Aspectos gametogenicos, morfométricos y fisiológicos que determinan el número de larvas que incuba *Ostrea chilensis* (Phillipi, 1845). Tesis de grado. Valdivia. Chile. Instituto de Biología Marina. Universidad Austral de Chile. 61 pp.

- MEGLITSCH, P. A. 1978. Moluscos en "Zoología de los Invertebrados". 10: 293-397.
- MORRICONI, E. y J. CALVO. 1979. Ciclo reproductivo y alternancia de sexos en *Ostrea puelchana*. Physis (A). 38 (95): 1-17.
- MORRICONI, E. y J. CALVO. 1980. Fertilidad y periodicidad del desove en *Ostrea puelchana*. Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero (Argentina). 2 (2): 57-67.
- O'FOIGHIL, D. 1989. Plaktotrophic larval development is associated with a restricted geographic range in *Lasaea*, a genus of brooding, hermaphroditic bivalves. Mar. Biol. 103: 349-358.
- O'SULLIVAN, B. W. 1980. The fertility of the Port Lincoln oyster (*Ostrea angasi*, Sowerby) from west lakes, South Australia. Aquaculture. 19: 1-11.
- ORTON, J. H. 1927. Observations and experiments on sex change in the European oyster (*Ostrea edulis*). Part I. The change from female to male. Journ. Mar. Biol. Assoc. U.K. 14 (4): 967-1045.
- ORTON, J. H. 1933. Observations and experiments on sex change in the European oyster (*Ostrea edulis*). Part III. On the fate on unspawned ova. Part IV. On the change from male to female. Journal. Mar. Biol. Assoc. U. K. 19 (1): 1-53.
- PADILLA, M., M. MENDEZ y F. CASANOVA. 1969. Observaciones sobre el comportamiento de la *Ostrea chilensis* en Apiao. Bol. Inst. Fom. Pesq. Santiago, 10: 1-28.
- QUAYLE, D. B. 1969. Pacific Oyster Culture. Fisheries Research Board of Canada. 65 pp.
- RAMORINO, L. 1970. Estudios preliminares sobre crianza de *Ostrea chilensis* en el laboratorio. Biol. Inst. Fom. Pesq. Chile. 4: 17-32.
- RICHARDSON, M. G. 1979. The ecology and reproduction of the brooding antarctic bivalve *Lissarca miliaris*. Br. Antart. Surv. Bull. 49: 91-115.
- RUSSELL, M. P., J. P. HUELSENBECK. 1989. Seasonal variation in brood structure of *Transennella confusa* (Bivalvia: Veneridae). Malacologia. 5 (2): 137-223.
- SASTRY, A. N. 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamark. Biol. Bull. 130: 118-134.
- SASTRY, A. N. 1970. Environmental regulation of oocyte growth in the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. Experientia. 26: 1371-1372.

- SOLIS, I. 1967. Observaciones biológicas en ostras (*Ostrea chilensis* Philippi) de Pullinque. Biol. Pesq. Chile. 2: 51-82.
- SOLIS, I. U. 1973. Valoración de colectores de larvas de ostras *Ostrea chilensis* Philippi en Pullinque. Biol. Pesq. Chile. 6: 5: 23 pp.
- SOLIS, I. y. P. EBERHARD. 1979. Ostra. Ostra Chilensis Philippi Lamellibranchia Anisomyaria Ostreidae. 1-30. In. CORFO-IFOP (Ed.) Estado actual de las principales pesquerías nacionales. Bases para un desarrollo pesquero. Moluscos.
- SPÄRCK, R. 1925. Studies on the biology of the oyster (*Ostrea edulis*) in the Limfjord, with special reference to the influence of temperature on the sex change. Report of the Danish Biological Station to the Board of Agriculture.
- STAFFORD, J. 1913. "The Canadian Oyster, its Development, Environmental and Culture". Ottawa. The Mortimer Company, Ltd. Ottawa, Canada.
- STORER, T. I. 1986. Moluscos en "Zoología General". 21: 485-516.
- THORSON, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 25: 1-45.
- TOMICIC, J. y J. BARILES. 1981. Manual de guía para el cultivo de la ostra (*Ostrea chilensis*) en la 2ª. Región de Chile. Univ. de Antofagasta. 73 pp.
- TORO, J. E. y J. E. WINTER. 1983. Estudios en la ostricultura Quempillén, un estuario del Sur de Chile. Parte I. La determinación de los factores abióticos y la cuantificación del seston como oferta alimenticia y su utilización por *Ostrea chilensis*. Mems. Asoc. Latinoam. Acuicult. 5 (2) : 129-144.
- TORO, J. E., MARIO. A. SANHUEZA., J. E. WINTER., CAROLINA. M. SENN., PABLO. AGUILA., ANA. M. VERGARA. 1995. environmental effects on the growth of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* in five mariculture locations in the Chiloé Island, Southern Chile. Aquaculture 136: 153-164.
- VÉLEZ, A and C. E. EPIFANIO. 1981. Effect of temperature and food ratio on gametogenesis and growth in the tropical mussel *Perna perna* (L). Aquaculture. 22: 21-26.
- WALNE, P. J. 1963. Breeding of the Chilean oyster (*Ostrea chilensis* Philippi) in the laboratory. Nature. 197: 676.
- WALNE, P. J. 1964. Observations on the fertility of the oyster (*Ostrea edulis*) J. Mar. Biol. Ass. U. K. 44 (2): 293-310.

- WALNE, P. J. 1979. Culture of Bivalve Mollusc, 50 years' experience at Conwy. Fishing News (Books) Ltda. Second edition. 189 pp.
- WILSON, J. H. and J.SIMONS. 1985. Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west coast of Ireland. Elsevier Science Publishers B. V. 46: 307-321.
- WILSON, J. A. 1988. Importancia de la alimentación en el acondicionamiento de reproductores de *Ostrea chilensis* Philippi (1945). Su efecto sobre la calidad de embrines y larvas. Sem. Invest. Licenc. Ciencias. Univ. Austral de Chile. 30 pp.
- WINTER, J. E., C. S. GALLARDO., J. ARAYA., J. E. TORO y A. GLEISNER. 1983. Estudios en la ostricultura Quempillén, un estuario del Sur de Chile. Parte II. La influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento y los períodos de reproducción de *Ostrea chilensis* Mems. Asoc. Latinoam. Acuicult. 5 (2): 145-159.
- WINTER, J., O. CHAPARRO.1987. Estado actual, necesidades y perspectivas de la acuicultura de moluscos bivalvos cultivados en aguas templadas del Pacífico de Sudamérica. Proceedings Taller trabajo sobre Acuicultura en América Latina. Lima, Perú. 261-270.
- WINTER, J., O. CHAPARRO., J. TORO., M. SANHUEZA., M. MATAMALA., A. GUTIRREZ., J. NAVARRO y H. ARRIAGADA. 1988. Desarrollo de la maricultura en Chiloé, Chile. Informe final proyecto 3-P-83-0200. Univ. Austral de Chile.147 pp.
- WILLIAMS, M. A. 1981. Quantitative methods in biology. 2. Stereological techniques. Vol 6. in : Glauert, A. M. (ed). North Holland Publishing Company. Amsterdam: p 5-84.

9. ANEXOS

TABLA 2. Proporción sexual de la población de *Ostrea chilensis*, muestreados en el estuario de Quempillén Ancud (Chiloé), entre septiembre del 2000 y septiembre del 2001. Resultados obtenidos a partir de las observación histológicas de los acinos foliculares.

Meses	Hembras		Machos		Hermafroditas	
	N	%	N	%	N	%
Septiembre 2000	1	4,3	13	56,5	9	39,1
Octubre 2000	1	3,4	16	55	12	41,4
Noviembre 2000	1	3,0	21	70	8	27
Diciembre 2000	0	0	15	58	11	42
Enero 2001	1	4,0	6	21	21	75
Febrero 2001	0	0	11	48	12	52
Marzo 2001	0	0	5	28	13	72
Abril 2001	0	0	10	36	18	64
Mayo 2001	0	0	11	48	12	52
Junio 2001	0	0	15	50	15	50
Julio 2001	0	0	17	61	11	39
Agosto 2001	0	0	10	40	15	60
Septiembre 2001	0	0	10	33	20	67
Total	4	1,2	160	46,9	177	51,9

TABLA 3. Frecuencias porcentuales de los diferentes estados de madurez gonadal para la población de *Ostrea chilensis* muestreados en el estuario de Quempillén Ancud (Chiloé), entre septiembre del 2000 y septiembre del 2001.

MESES	ESTADOS DE MADURACIÓN GONADAL					
	Inmaduros %	M. Inicial %	M. Máxima %	Emisión %	Regresión %	N° de individuos
Septiembre 2000	4.4	0.0	56.5	26.1	13.0	23
Octubre 2000	0.0	0.0	44.8	44.8	10.3	29
Noviembre 2000	3.3	0.0	60.0	33.3	3.3	30
Diciembre 2000	0.0	15.4	26.9	38.5	19.2	26
Enero 2001	3.6	64.3	10.7	7.1	14.3	28
Febrero 2001	0.0	43.5	13.0	30.4	13.0	23
Marzo 2001	0.0	22.2	0.0	16.7	61.1	18
Abril 2001	7.1	46.4	7.1	14.3	25.0	28
Mayo 2001	0.0	39.1	8.7	13.0	39.1	23
Junio 2001	0.0	33.3	10.0	23.3	33.3	30
Julio 2001	0.0	39.3	7.1	46.4	7.1	28
Agosto 2001	4.0	44.0	8.0	12.0	32.0	25

TABLA 4. Valores de peso, tamaño y volumen de *Ostrea chilensis* muestreados en el estuario de Quempillén Ancud (Chiloé).

Número de muestra	Tamaño cms.	Peso grs.	Volumen ml.
1	5,5	3,1	3,0
2	5,8	3,3	2,5
3	5,5	2,9	2,8
4	5,3	2,8	3,0
5	4,5	1,4	1,0
6	5,4	2,8	2,5
7	4,8	1,9	1,5
8	4,9	2,2	2,0
9	4,9	2,1	2,2
10	5,2	2,6	2,5
11	4,9	1,1	1,5
12	4,8	2,1	3,0
13	5,2	2,2	2,5
14	5,5	2,9	3,0
15	4,7	1,3	1,0
16	4,8	2,1	2,0
17	5,2	1,5	1,5
18	4,4	2,3	2,0
19	5,1	3,1	3,0
20	5,1	1,8	1,0
Promedio	5,5	2,3	2,2

TABLA 5. Fecundidad potencial y sus promedios mensuales de *Ostrea chilensis* muestreados entre septiembre del 2000 y diciembre del 2001, en el estuario de Quempillén Ancud (Chiloé).

N° de muestra	MESES			
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
1	4.177	10.012	3.017	238.383
2	25.604	644	3.171	7.652
3	586.637	19	12.959	295
4	5	2.707	-	18.355
5	45	180	-	172
6	4.156	43	-	34
7	40.590	-	-	47.249
Promedio	94.459	2.268	63.82	44.591

TABLA 6. Mediciones de los ovocitos maduros de *Ostrea chilensis* muestreados entre septiembre del 2000 y septiembre del 2001, en el estuario de Quempillén Ancud (Chiloé).

Tamaño de los ovocitos				
160,2	164,9	170,0	175,4	186,5
160,7	164,9	170,5	177,2	187,0
160,9	165,3	170,9	177,7	189,2
161,1	165,3	170,9	178,5	189,6
161,1	165,6	171,2	178,6	189,9
161,3	165,6	171,5	178,7	190,0
161,5	165,6	171,5	179,1	191,3
161,5	165,7	171,8	179,1	191,8
161,6	165,9	171,9	179,3	192,0
161,6	166,3	171,9	179,6	193,6
161,7	166,5	172,7	180,8	193,9
161,7	166,5	172,8	182,2	194,5
162,1	167,0	173,2	183,2	194,8
162,9	167,5	173,3	183,3	196,3
163,6	167,9	173,6	183,3	200,1
163,9	168,5	173,7	184,0	200,5
164,4	168,7	173,8	184,0	203,7
164,6	168,8	174,6	184,8	205,4
164,7	168,9	174,6	184,8	-
164,7	169,1	175,3	185,0	-
164,8	169,9	175,4	186,3	-

PROTOCOLO N° 1

- 1.- Alcohol 50% por 15 minutos hasta eliminar el exceso de fijador.
Alcohol 70% por 20 minutos.
Alcohol 80% por 20 minutos.
Alcohol 90% por 20 minutos.
Alcohol 96% por 20 minutos.
Alcohol 100% por 30 minutos.
Alcohol 100% por 30 minutos.

- 2.- Alcohol 100% + Xilol por 15 minutos.
Xilol por 10 minutos.
Xilol por 10 minutos.

- 3.- Xilol + Paraplast por 15 minutos
Paraplast I por 20 minutos a 56-57° C.
Paraplast II por 20 minutos a 56-57° C.
Paraplast III por 20 minutos a 56-57° C.

- 4.- Inclusión en Paraplast.

- 5.- Tinción Hematoxilina Eosina.
 - Desparafinado
 - Xilol I por 10 minutos.
 - Xilol II por 10 minutos.

 - Hidratación
 - Alcohol 100% por 5 minutos.
 - Alcohol 96% por 5 minutos.
 - Alcohol 80 % por 5 minutos.
 - Alcohol 70 % por 5 minutos.

- Lavado en agua corriente por 5 minutos.
- Tinción nuclear (Hematoxilina de Harris) por 3 a 5 minutos.
- Lavado en agua corriente por 20 minutos.
- Tinción citoplasmática (Eosina) por 3 a 4 minutos.
- Deshidratación
 - Lavado en alcohol 80%.
 - Lavado en alcohol 96%.
 - Alcohol 96 % por 2 a 5 minutos.
 - Alcohol absoluto por 2 a 5 minutos.
 - Alcohol absoluto por 5 minutos.
- Transparencia (Refringencia)
 - Xilol fenicado por 5 minutos.
 - Xilol I por 5 minutos.
 - Xilol II por 5 minutos o más.
- Montaje de los cortes con cubreobjeto utilizando resina sintética (Permount).
- Secado a T° ambiente por mínimo de 24 hrs.