Bol. Soc. Biol. de Concepción, Tomo LI, 1981, pp. 47 - 59.

CICLO ANUAL DE REPRODUCCION DE ARBACIA SPATULIGERA (VALENCIENNES, 1846) EN LA BAHIA DE CONCEPCION, CHILE. (ECHINOIDEA, ARBACIIDAE). *

ENRIQUE BAY-SCHMITH B. **

RESUMEN

Se estudia el ciclo anual gametogénico del erizo de mar *Arbacia spatuligera,* (Valenciennes, 1846) en la Bahía de Concepción (36º39'S, 73º06'W). La gametogénesis comienza en Enero y la postura ocurre en primavera, principalmente en Octubre y Noviembre. La población de fagocitos nutritivos nunca alcanza una predominancia sobre las otras células gonádicas, especialmente en los machos donde está constreñida en una zona de la capa espermatogénica. Gametos maduros se presentan en ambos sexos a lo largo del año siendo posible obtener estados de desarrollo mediante fecundación *in vitro* desde Febrero a Noviembre.

ABSTRACT

The gametogenic cycle of the sea urchin *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846) in the Bay of Concepción (36º39'S, 73º06'W) is followed over a year. Gametogenesis begins in January to spawn out in Spring, mainly October and November. The population of nutritive phagocytes never reaches a predominance over the remaining gonadal cells specially in males where it is confined to an area within the layer of spermatogenic cells. In both sexes mature gametes are found thoughout the year, being possible to get developmental stages by means of *in vitro* fertilization from February through November.

INTRODUCCION

Entre los muchos aspectos desconocidos de los equinodermos de Chile figuran los ciclos de reproducción. De las 8 especies de equinodermos regulares que habitan el litoral continental chileno (Larraín, 1975) sólo el erizo comestible, *Loxechinus albus* (Molina, 1782) ha sido motivo de estudios en este tema (Gutiérrez y Otsu, 1975; Bückle, com. pers.).

* Estudio financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Concepción.

** Departamento Biología Celular, Instituto de Biología, Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción, Chile.

El desarrollo larvario de esta especie fue descrito por Arrau (1958) y posteriormente Bückle *et al.* (1976) hicieron valiosos aportes a la técnica de cultivo masivo de sus estados premetamórficos.

El aspecto macroscópico de la gónada de los equinoideos en general es el de un denso racimo formado por lóbulos cilíndricos que irradian de un conducto central; cortes histológicos perpendiculares al eje longitudinal de estos lóbulos permiten visualizar secciones circulares de los mismos en los que se aprecia una marcada delimitación entre los gametos y los estados indiferenciados o en crecimiento y diferenciación. Los primeros se ubican en el lúmen en tanto que las diferentes formas gametogénicas se estratifican en la región cortical de los lóbulos. Gracias a esta disposición de los tejidos gonádicos se han podido establecer estimaciones cuantitativas del proceso gametogénico midiendo el grosor de las capas celulares de testículos especialmente (Holland 1967; Pearse, 1969), o bien evaluando el área ocupada por cada población de células en secciones circulares de testículos y ovarios (Holland y Holland, 1969). Es este último método el que se intenta aplicar en el estudio del ciclo reproductivo de erizos chilenos.

En la costa occidental de la Bahía de Concepción (36º39'S, 73º06'W) además de *Loxechinus albus* se encuentran abundantes ejemplares de otros dos erizos, *Tetrapygus niger* (Molina, 1782) y *Arbacia spatuligera* (Valenciennes, 1846). De ellos no hay antecedentes publicados sobre el comportamiento gonádico, pero últimamente se han efectuado estudios enzimológicos en gametos de *T. niger* (Sánchez et al., 1977).

Este primer informe es el resultado del análisis histológico del proceso de gametogénesis en *A. spatuligera* realizado durante el año 1976 y parte de 1977.

MATERIALES Y METODOS

Arbacia spatuligera habita los fondos rocosos y arenosos del sublitoral de la Península de Tumbes, en la Bahía de Concepción, desde los 6 metros de profundidad, encontrándose en mayor abundancia a los 10 metros. Allí es un elemento de importancia en la comunidad del mitílido *Aulacomya ater*. Por su alimentación constituida básicamente de balánidos, el erizo presta un apreciable servicio al molusco limpiando sus valvas de organismos incrustantes (Bay-Schmith, en preparación).

De las muestras mensuales obtenidas por buceo autónomo se analizan 10 machos e igual número de hembras con tamaños no inferiores a 5 cm. de diámetro del caparazón. Las dimensiones del caparazón eran medidas con un pie de metro con aproximación de 0.1 mm. El organismo vivo, mantenido en agua de mar hasta el momento de su procesamiento, era pesado en una balanza Ohaus (0.1 gr.) dejando estilar previamente por 15 segundos. Un corte circular en la membrana peristomial permitía extraer la linterna de Aristóteles y cortando con tijeras dos áreas ambulacrales opuestas se partía el caparazón en dos mitades. Las gónadas se extirpaban y su volumen era medido por desplazamiento en una probeta graduada con agua de mar.

La fluctuación estacional del volumen gonádico fue valorada con un índice gonádico calculado mediante la fórmula siguiente:

$$I.G. = \frac{\text{Volumen gonádico}}{\text{Peso total del erizo}} \times 100$$

El extremo oral de una de las 5 gónadas se fijaba en Bouin para posteriormente incluir en parafina y teñir con Hematoxilina-Eosina. Los trozos de gónada eran orientados con sus lóbulos perpendiculares a la dirección del corte. El análisis de las secciones transversales de lóbulos testiculares con un diámetro de 622± 100 μ y de 7 μ de espesor se basó en el método de Holland y Holland (1969), que permite cuantificar el proceso gametogénico siguiendo las variaciones en extensión del área de las poblaciones de células expermatogénicas (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas), de fagocitos nutritivos y de gametos. En las hembras no se pudo aplicar esta misma técnica porque los espacios intercelulares de los óvulos variaban considerablemente entre el comienzo y la culminación de la etapa proliferativa, falseando la extensión real de esa población celular. En cambio, se consideró el crecimiento en tamaño de los ovocitos y su maduración en el lúmen gonádico como una expresión mensurable y representativa del proceso reproductivo (Pearse, 1969). Un total de 50 ovocitos nucleolados y óvulos nucleados de cada erizo fuedon medidos y agrupados en clases de tamaño de 15 μ, graficando la distribución de frecuencias en porcentaje de los grupos de tamaño considerados.

En ambos sexos los fagocitos nutritivos no conformaban una capa de tejido coherente, de modo que la cantidad de estas células se estimó subjetivamente adoptando una escala de graduación relativa: ausente, escaso, moderado, abundante y dominante.

La madurez citológica de los óvulos y espermios presentes desde Febrero a Noviembre era comprobada mediante inseminación *in vitro*. Los gametos se obtenían por inoculación intracelómica de 2 ml. de KCl 0,5M, o bien por extirpación y ruptura de las gónadas. Los cultivos se mantenían en recipientes de vidrio con 200 ml. de agua de mar a 15º C.

RESULTADOS

Las gónadas de *Arbacia spatuligera* presentan una coloración característica para cada sexo. Los ovarios en las hembras tienen durante todo el año un color rojo oscuro. En cambio, en los machos, los testículos son amarillos en plena madurez y café claro cuando se contraen después del desove. Histológicamente la pared de la gónada de ambos sexos es de constitución similar a la de otros equinoídeos. Un epitelio de células planas tapiza la gónada externamente. En su parte media yace una banda de tejido conectivo muscular que se constriñe notoriamente con la expansión del contenido interno de la gónada. La cara interna de la pared gonádica la forma una capa de células germinales sobre la cual se estratifican gametocitos en distintos estados de desarrollo. En el lúmen

se depositan los gametos maduros, espermios u óvulos. En las hembras también se pueden encontrar allí ovocitos que han alcanzado su tamaño definitivo.

El ciclo anual que experimentan las gónadas, con una etapa de proliferación de gametos y luego la liberación de los mismos, se manifiesta en las variaciones mensuales del índice gonádico (Fig. 1). A partir de Enero el volumen de ovarios y testículos aumenta hasta llegar a un máximo en Septiembre. En Octubre los machos no manifiestan mayores modificaciones, en cambio, entre las hembras surgen ejemplares con índices gonádicos notoriamente inferiores al mes precedente. En los primeros días de Noviembre esta condición se generaliza a toda la población de erizos. La tendencia decreciente del índice gonádico es muy leve durante este mes e incluso inapreciable en los machos. De todos modos, los valores mínimos se detectan en Diciembre y ya a comienzos de Enero es evidente la reanudación del ciclo con un notorio incremento en el volumen gonádico.

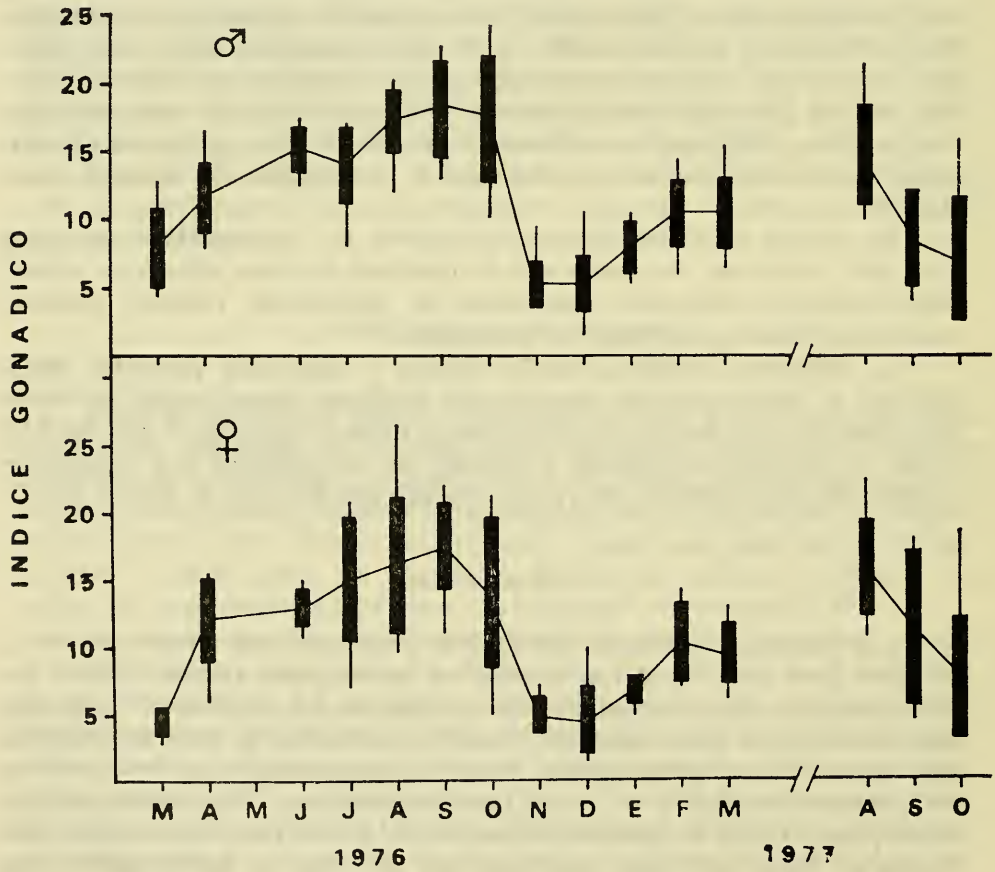


Fig. 1.— Variación del promedio mensual, desviación estandar (rectángulo vertical) y valores extremos (línea vertical) del índice gonádico en machos (gráfico superior) y hembras (gráfico inferior) de *A. spatuligera* en Tumbes.

En la Fig. 1, también se observa que los valores promedios del índice gonádico tienen un mismo patrón de variación estacional en machos y hembras. Además la periocidad del ciclo no es cronologicamente constante; mediciones efectuadas en Agosto, Septiembre y Octubre de 1977, muestran con respecto al año anterior un desface de 1 a 2 meses en el inicio de la etapa decreciente del ciclo. En 1976 las primeras hembras que experimentan una reducción de la gónada surgen en Octubre y en los machos esto no se manifiesta antes de Noviembre, en cambio al año siguiente el proceso ha comenzado simultáneamente en ambos sexos en el mes de Septiembre.

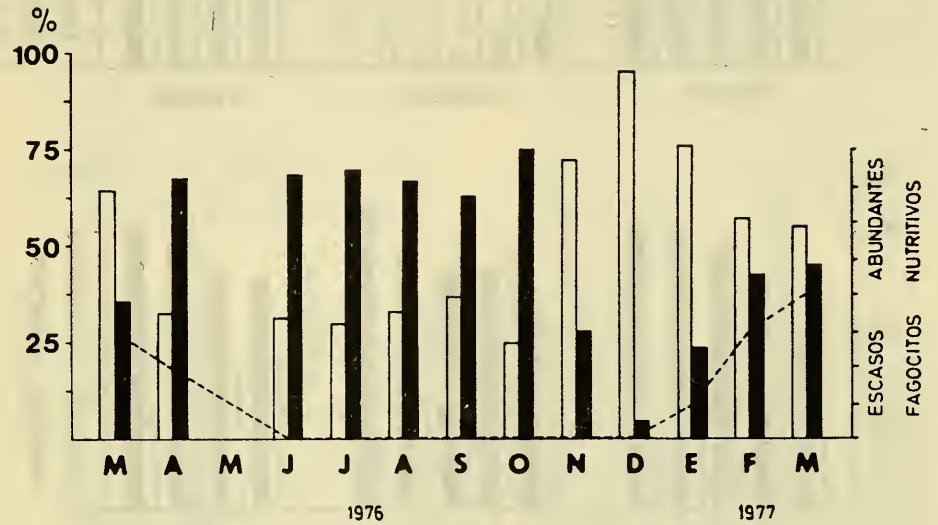


Fig. 2.— Promedios mensuales de la distribución porcentual del área ocupada por las poblaciones de células espermatogénicas (barras blancas) y de espermios (barras negras), y abundancia relativa del tejido fagocítico nutritivo (línea de trazos) en secciones transversales de lóbulos testiculares de *A. spatuligera.*

El análisis de los cortes transversales de lóbulos testiculares presentados en la Fig. 2 y 3, muestra la presencia de espermios prácticamente en todo el año. Estos gametos se disponen en el lúmen testicular formando una masa densa delimitada por la capa cortical de células gametogénicas (Lámina I). Desde Enero a Marzo, los espermios tienen una moderada representación aunque en paulatino incremento. Esto conlleva una reducción recíproca del espesor de la capa gametogénica. La expansión de la masa de espermios se acentúa en Abril llegando a ocupar un alto porcentaje del área lobular que se mantiene con leves variaciones hasta Octubre. La cantidad absoluta de gametos maduros en la gónada sin embargo, continúa aumentando como lo indica el incremento total del volumen gonádico (Fig. 1).

La significativa inversión en la dominancia del área de las secciones de lóbulos testiculares que ocurre en Noviembre, marca el comienzo de la postura. La brusca reducción del índice gonádico es una consecuencia directa de este hecho.

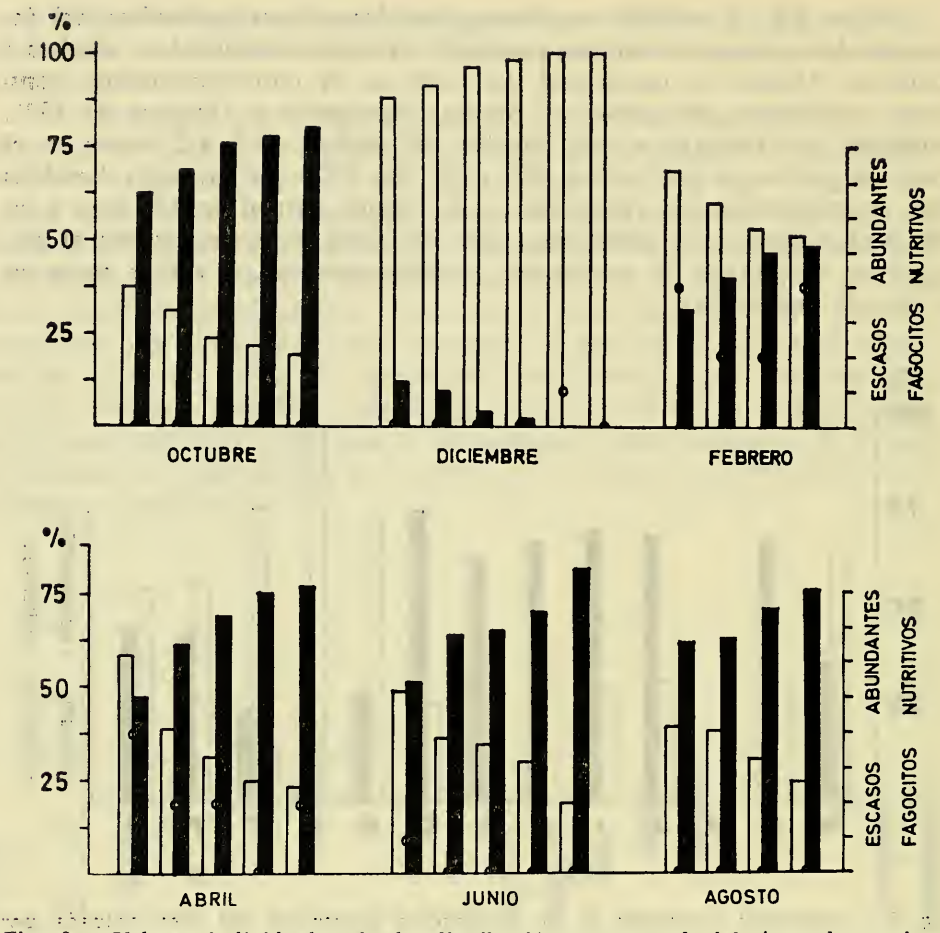


Fig. 3.— Valores individuales de la distribución porcentual del área de secciones transversales de lóbulos testiculares, ocupada por las poblaciones de células espermatogénicas (barras blancas) y de espermios (barras negras) de *A. spatuligera* en diversas épocas del año. La abundancia relativa de fagocitos nutritivos se representa por círculos.

Aún, cuando la emisión de espermios continúa entre Noviembre y Diciembre, el volumen de los testículos no sufre cambios apreciables en este período debido al efecto compensatorio generado por el aumento considerable de la capa espermatogénica. Una vez concluida la postura, el remanente de espermios en el lúmen testicular es mínimo, como puede apreciarse en la proporción de células sexuales de diferentes individuos capturados en Diciembre (Fig. 3).

Los fagocitos nutritivos están escasamente representados en *A. spatuligera*. Su presencia en los machos se limita al período de postfreza entre Enero y Mayo. Su distribución en el lóbulo gonádico es muy restringida; nunca se les encuentra libres en el área medular, por el contrario, están delimitados a la capa cortical de células gametogénicas, formando una estrecha banda entre los espermatocitos y las espermátidas. Básicamente presentan granulaciones basófilas y su membrana celular es poco conspicua.

En las hembras la distribución de frecuencia en porcentaje del tamaño de los ovocitos y óvulos (Fig. 4) muestra, como en los machos, que hay gametos maduros a lo largo del año (Lámina II). En la región cortical del lóbulo ovárico se ubican las ovogonias y ovocitos primarios en distintos estados de crecimiento. La membrana folicular que los retiene en la capa gametogénica se rompe normalmente cuando sobrepasan los 40 μ de diámetro, pero también pueden persistir allí hasta los 75 μ. Al ingresar al lúmen ovárico, el ovocito primario cambia su estructura nuclear mediante la reducción meiótica. En ovocitos de 60 μ de diámetro, la vesícula germinal modifica su tamaño desde 37 μ de diámetro a un pronucleo de 11 μ. La dimensión del óvulo medido en material fresco es de 86±4 μ, mientras que en los cortes histológicos mide 62±7 por la contracción que ocasiona la fijación del tejido.

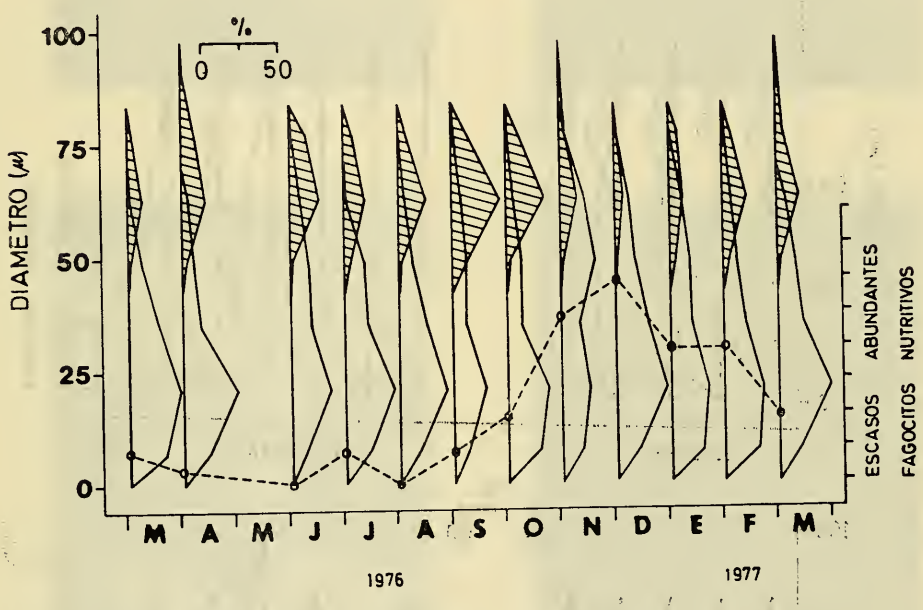


Fig. 4.— Polígonos de frecuencia promediada, en porcentaje, del tamaño de ovocitos y óvulos (área rayada), y abundancia relativa del tejido fagocítico nutritivo (línea de trazos) en cortes de ovario de *A. spatuligera*.

En los erizos hembras capturados en el mes de Enero se aprecia la primera irrupción de ovocitos libres y óvulos al lúmen del lóbulo ovárico, en detrimento de la expansión del tejido gametogénico. Este proceso continúa en los meses siguientes, de modo que en Junio sólo hay un delgado estrato celular en la región cortical de los lóbulos. En Agosto y Septiembre este tejido aparece discontinuo, con sus componentes aplastados por la densa masa de gametos. El desove comienza en Octubre y a fines de Noviembre la gran mayoría de los ejemplares han completado la postura. Los ovarios en el mes de Diciembre contienen una escasa cantidad de óvulos y la capa gametogénica se extiende hacia el lúmen con evidentes signos de actividad fagocítica.

La participación de los fagocitos nutritivos en el ciclo gonádico es más evidente en las hembras que en el otro sexo, pero tampoco llegan a constituir agrupaciones de células que permita mensurar su extensión en el lóbulo. Se presentan como elementos dispersos en la capa gametogénica, a menudo adheridos a ovocitos de variados tamaños pero no a los óvulos libres del lúmen ovárico. En el mes de Septiembre y con más propiedad en Octubre, comienzan a aparecer las células fagocíticas. La mayor abundancia de este células se encuentran en Diciembre, las cuales decrecen hasta prácticamente desaparecer en Junio. Las granulaciones citoplasmáticas predominantes en el ciclo de estas células son basófilas, con presencia de corpúsculos eosinófilos en Febrero, Marzo y en algunas otras ocasiones en que estas células se manifiestan en ciertos individuos como ocurrió en el mes de Julio (Fig.4).

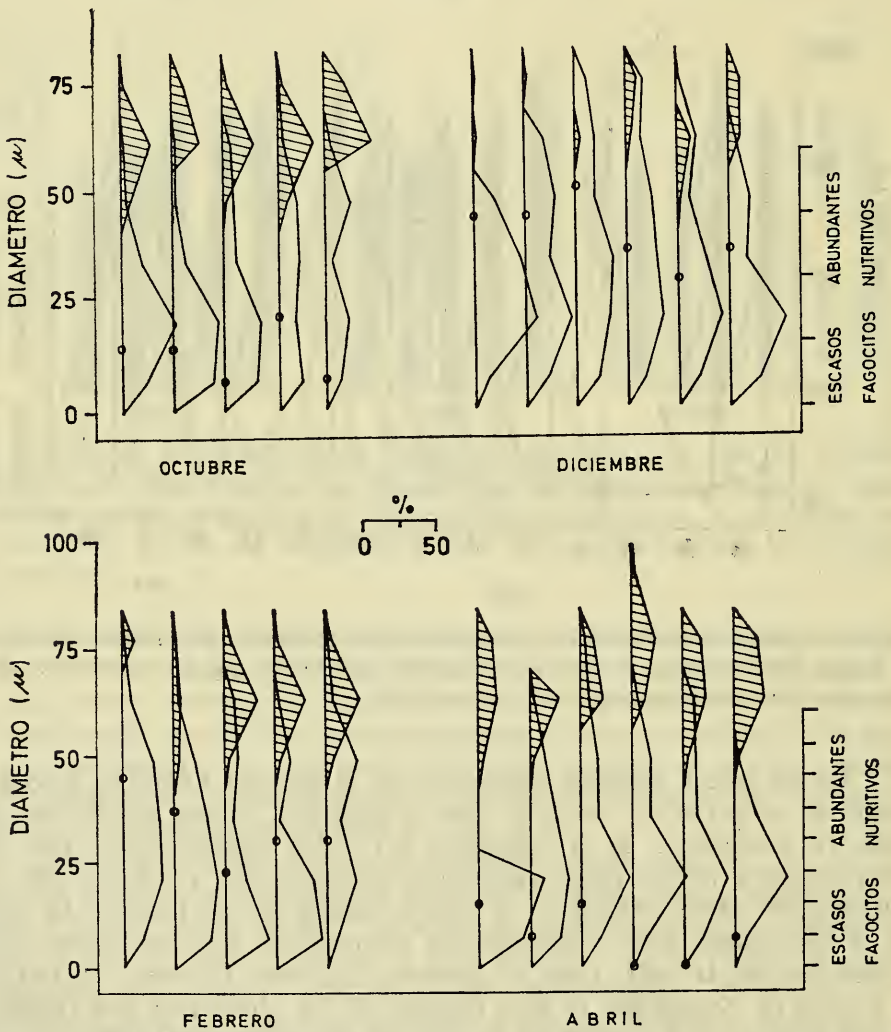
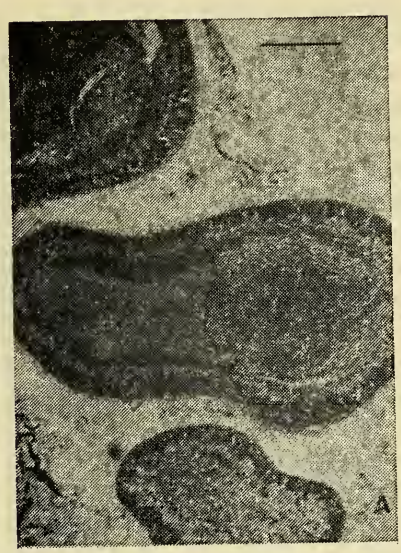
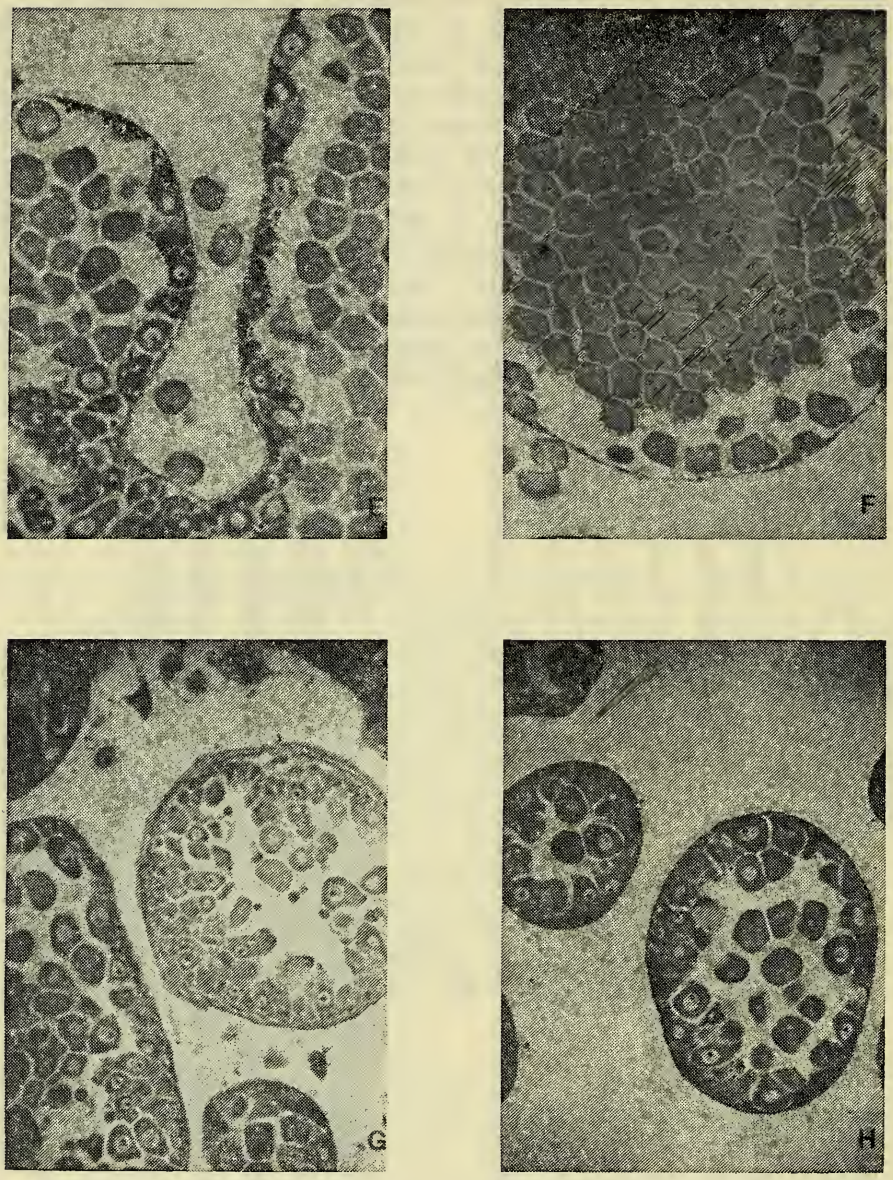


Fig. 5.— Valores individuales de la distribución de frecuencia en porcentaje del tamaño de ovocitos y óvulos (área rayada), y abundancia relativa del tejido fagocítico nutritivo (círculo) en cortes de ovario de *A. spatuligera* en diversas épocas del año.



Lám. I.— Secciones transversales de lóbulos testiculares de *Arbacia spatuligera*. Fig. A. 6 de Abril de 1976 Lóbulos con una estrecha zona cortical de células espermatogé nicas en la que se distingue una banda de fagocitos nutritivos de color claro. Una densa masa de espermios ocupa la cavidad lobular. Fig. B. 6 de Octubre de 1976. El grosor de la capa cortical es similar al mes de Abril pero carece de fagocitos nutritivos. Espermios muy abundantes. Fig. C. 1º de Diciembre de 1976. Al término de la postura, lóbulos con una extensa capa de células espermotogénicas y el lúmen vacío o con reducidos grupos de espermios. Fig. D. 3 de Febrero de 1977. Persiste una capa espermatogénica considerable y en el lúmen se acumulan nuevos espermios. La escala indicada en la Fig. A equivale a 150 μ y es válida para las figuras restantes.



Lám. II.— Secciones transversales de lóbulos ováricos de *Arbacia spatuligera*. Fig. E. 6 de Abril de 1976. Capa cortical con ovocitos de diversos tamaños. Ovulos en el lúmen. Fig. F. 6 de Octubre de 1976. Capa cortical aplastada y con elementos esporádicos. Lúmen repleto de óvulos. Fig. G. 1º de Diciembre de 1976. Lóbulos desovados con una notoria actividad gametogénica. Ovulos escasos. Fagocitos nutritivos con glóbulos oscuros se aprecian entre los ovocitos. Fig. H. 3 de Febrero de 1977. Ovocitos dispuestos en la región cortical aún prominente. Algunos óvulos libres en el lúmen. Fagocitos restringuidos a la región cortical. La escala indicada en la Fig. E equivale a 150 μ y es válida para las figuras restantes.

Los procesos citológicos que conforman el ciclo gonádico son bastantes sincrónicos entre individuos de un mismo sexo, así como también entre machos y hembras. En las Figs. 3 y 5 se aprecia que la amplitud del rango de variación del estado de madurez gonádica es estrecha entre los ejemplares colectados en una misma fecha.

Con los óvulos y espermios presentes desde Febrero a Noviembre, es posible obtener larvas viables a partir de inseminación *in vitro,* pero en los primeros meses del ciclo la proporción de gametos maduros es baja, lo que favorece la contaminación en los recipientes por la desintegración de los ovocitos y embriones anormales.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La cantidad de tejido fagocítico nutritivo en las gónadas de *A. spatuligera* es relativamente menor a lo que se ha descrito en otras especies de equinoídeos regulares, cuya gametogénesis ha sido estudiada histológicamente *(Strongylocentrotus nudus* y *S. intermedius,* Fuji, 1960; *Sterechinus neumayeri,* Pearse y Giese, 1966; *Prionocidaris baculosa* y *Lovenia elongata,* Pearse, 1969; *Psammechinus microtuberculatus,* Holland y Holland, 1969). En esas especies la actividad fagocítica se desencadena con el desove, participando en la eliminación de los gametos remanentes y de aquellos nuevos elementos que se van diferenciando fuera de la estación reproductiva (Pearse, 1969). Esta labor de limpieza en *A. spatuligera* no se ejecuta a nivel de óvulos y espermios. En efecto, la distribución del tejido fagocítico nutritivo en el lóbulo gonádico es eminentemente cortijal lo cual sugiere que su acción está dirigida al tejido gametogénico tanto en el aspecto nutricional como fagocítico. Esto induce a reconocer en esas células una participación preferencial en el control de la proliferación de gametos durante los primeros meses del ciclo reproductivo. Sin embargo, la eficiencia en este aspecto es poco notable, considerando que la incorporación de gametos maduros al lúmen de la gónada se inicia en forma progresiva desde Enero, habiendo concluido recién el período de postura en Diciembre. Es posible que en esto influya la baja densidad de fagocitos nutritivos indicada anteriormente, lo cual implicaría que de la mayor o menor abundancia del tejido fagocítico dependerá la destrucción total o parcial de las células gametogénicas que proliferan con mucha antelación al período de desove.

Pearse (op. cit.) señala que aún no está claro si previo a la fagocitosis ocurre una autodesintegración de los elementos fagocitados pero considera que probablemente los fagocitosis está condicionada a la presencia de células en degradación.

Si interpretamos las características histológicas de la gónada de *A. spatuligera* después del desove en base a esta hipótesis, tendríamos que reconocer que la autodesintegración no es extensiva a toda la población gametogénica por igual, desde el momento que algunas células ajenas a este designio pueden diferenciarse en los primeros meses del ciclo y perdurar como gametos hasta la próxima postura. Esta diferencia cualitativa entre células de un mismo tejido y durante un tiempo limitado es menos

probable que un cierto control por parte de los fagocitos en la cantidad de tejido gametogénico degradado. Como en esta especie los fagocitos no son muy numerosos quedarían suficientes células gametogénicas sin destruir, las que en última instancia son los gametos que aparecen en los cortes de gónada del mes de Enero.

En la península de Tumbes, *A. spatuligera* tiene un solo ciclo de reproducción en el año. El período de desove se inicia en Septiembre u Octubre, esto es variable entre un año y otro, y se prolonga por 2 ó 3 meses, pero es a lo largo del mes de Octubre donde el grueso de la población lanza sus gametos al mar.

La temprana actividad gametogénica de esta especie y la plena madurez de los gametos acumulados en el lúmen de la gónada desde un comienzo del ciclo, inducen a pensar en una preparación demasiado prematura de la postura que no se lleva a cabo sino después de varios meses. Considerando que las muestras estudiadas corresponden a una población de *A. spatuligera* distante en no más de 5 grados latitudinales de su límite más austral de distribución, no sería extraño encontrar poblaciones de este erizo en otras localidades, probablemente más al Norte, en donde condiciones ambientales diferentes a las de Bahía Concepción permitan la ocurrencia de más de una postura en el año. Otra especie del mismo género *A. lixula* (L.), presenta un comportamiento de este tipo en la costa mediterránea francesa (Fenaux, 1968). También en poblaciones del erizo *Loxechinus albus,* de Antofagasta, en el Norte de Chile, Gutiérrez y Otsu (1975) han detectado una primera postura en Noviembre y dos menores en Febrero y Abril, en cambio en Valparaíso, Bückle *et al.* (1978) hacen mención de una sola desde Agosto o Septiembre hasta Octubre.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a la Sra. Doris Huerta C. por su colaboración en el desarrollo del trabajo; al Sr. Arturo Chamorro y a la Srta. Margarita Troncoso por la ayuda prestada en el tratamiento de las muestras.

BIBLIOGRAFIA

Arrau, L. 1958. Desarrollo del erizo comestible de Chile *Loxechinus albus.* Mol. Revista de Biología Marina 7 (1, 2 y 3): 39 - 62.

Bückle, F., Guisado, Ch., Tarifeño, E., Zuleta, A., Córdova, L., Serrano C. y Maldono R. 1976. Estudios biológicos del erizo *Loxechinus albus,* (Molina) (Echinoidea, Echinodermata). I. Investigaciones preliminares en cultivo masivo de larvas de erizo. Biol. Pesq. Chile. *8:* 31 - 64.

Bückle, F., Alveal, K., Tarifeño, E., Guisado, Ch., Córdova, L., Valenzuela, J., Serrano C. 1978. Biological studies on the Chilean sea-urchin *Loxechinus albus* (Molina) (Echinodermata; Echinoidea). V. Food analysis and seasonal feeding rate. (En preparación).

Fenaux L. 1968. Maturation des gonades et cycle saisonnier des larvas chez *A. lixula, P. lividus* et *P. microtuberculatus* (echinides) á Villefranche-sur-Mer. Vie et Milieu 19(1-A): 1-52.

Fuji, A. 1960. Studies on the Biology of the sea urchin. I. Superficial and histological gonadal changes in gametogenetic process of two sea urchins, *Strongylocentrotus nudus* and *S. intermedius*. Bull. Fac. Fish Hokkaido 11(1): 1-14.

Gutiérrez, J. & Otsu, I. 1975. Periocidad en las variaciones biométricas de *Loxechinus albus* Molina. Rev. Biol. Mar. Valparaíso, *15*(2): 179 - 199.

Holland, N.D. 1967. Gametogenesis during the annual reproductive cycle in a cidaroid sea urchin. *(Stylocidaris affinis)*. Biol. Bull. *133:* 578 - 590.

Holland, N.D. & Holland, L.Z. 1969. Annual cycle in germinal and nongerminal cell populations in the gonads of the sea urchin *Psammechinus microtuberculatus*. Publ. Staz. Zool. Napoli *37:* 394 - 404.

Larraín, A. 1975. Los equinoídeos regulares fósiles y recientes de Chile. Gayana Zool. *35:* 1–189.

Pearse, J.S. 1969. Reproductive periodicities of Indo-Pacific invertebrates in the Gulf of Suez. I. The echinoids *Prionocidaris baculosa* (Lamark) and *Lovenia elongata* (Gray). Bull. Mar Sci. *19* (2): 323 - 350.

Pearse, J.S. & Giese, A.C. 1966. Food, reproduction and organic constitution of the common antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri* (Meissner). Biol. Bull., *130:* 387 - 401.

Sánchez, L., Ponce, O., Henríquez, S., Raddatz, O. 1977. Aislamiento y caracterización parcial de proteínas de ovocitos maduros de erizo negro. Resúmenes de las comunicaciones al XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. 10 - 14 de Julio, 1977. Pág. 243. México.