

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



E.T.S. INGENIEROS DE CAMINOS, CANALES Y PUERTOS.

DPTO. DE CIENCIAS Y TÉCNICAS DEL AGUA Y DEL MEDIO AMBIENTE.

AREA DE ECOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DEL ERIZO DE MAR *Paracentrotus lividus* (LAMARCK, 1816) EN EL MAR CANTÁBRICO: CICLO GONADAL Y DINÁMICA DE POBLACIONES

Presentada por: **JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ IRUSTA**

Dirigida por: **JUAN CARLOS CANTERAS JORDANA**
GERARDO GARCÍA-CASTRILLO RIESGO

Santander, julio 2009

CAPÍTULO 3

CICLO GONADAL

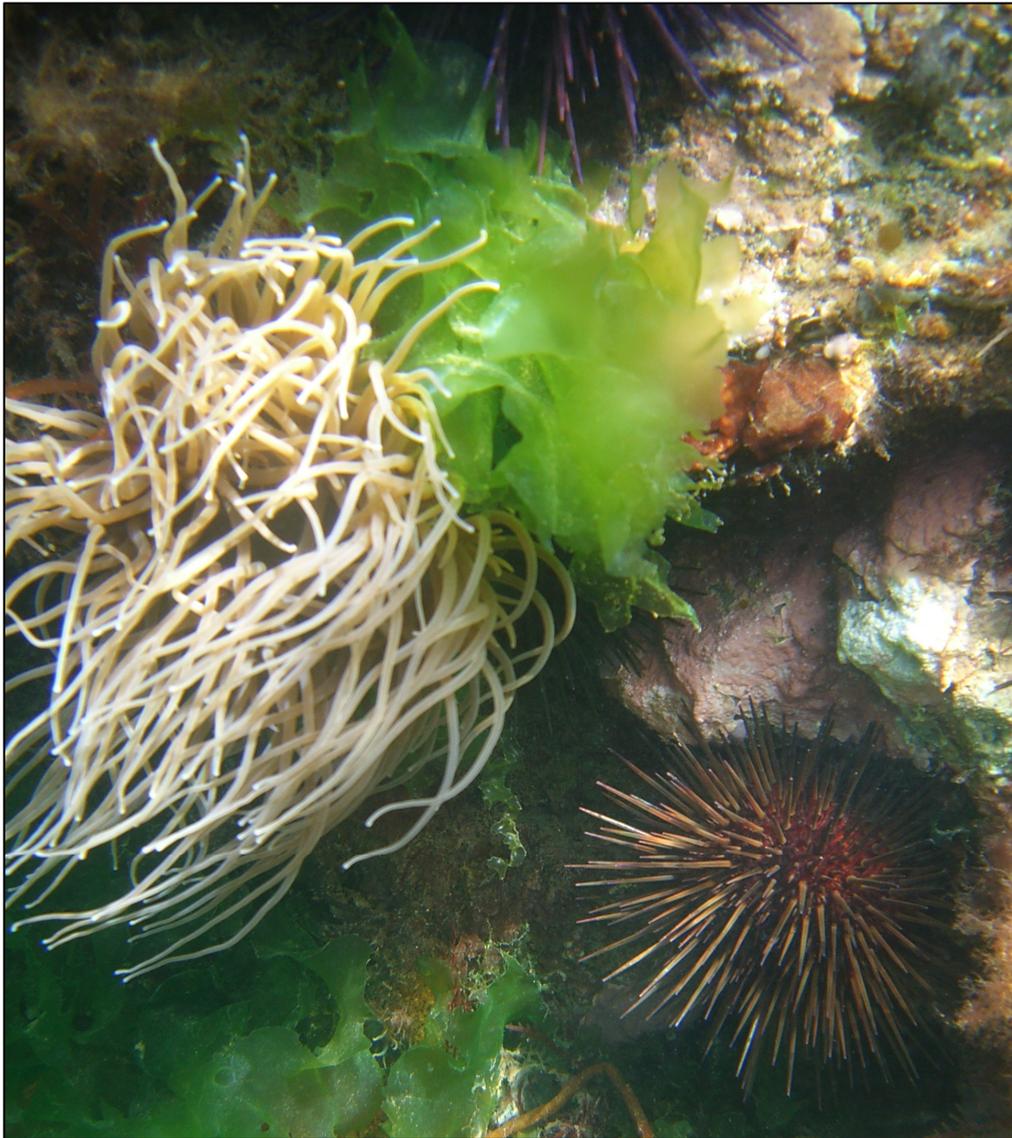


Foto de Manuel Caballer

Parte del contenido de este capítulo ha sido aceptado para su publicación en:

González-Irusta, J.M.; Goñi de Cerio, F.; Canteras, J.C. Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea. Environmental effects. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom

CAPÍTULO 3: CICLO GONADAL

3.1. INTRODUCCIÓN

La parte comestible de *P. lividus*, como en todas las especies de erizos, son sus gónadas. Por esta razón la variación anual de las gónadas es uno de los aspectos más estudiados de su ciclo biológico. Su ciclo gonadal ha sido estudiado ampliamente, tanto en el Atlántico como en el Mediterráneo.

Las poblaciones atlánticas han sido estudiadas desde Irlanda (Crapp y Willis, 1975; Byrne, 1990), hasta las Islas Canarias (Girard *et al*, 2006), pasando por Bretaña (Allain, 1972; Spirlet *et al* 1998), Asturias (Haya de la Sierra, 1990), Galicia (Catoira, 1995; Montero y García, 2003), Portugal (Gago *et al*, 2003), Andalucía (Sánchez-España, 2004) y Marruecos (Bayed *et al*, 2005).

Las poblaciones mediterráneas también han sido muy estudiadas, si bien no existen apenas trabajos en la parte más oriental. La zona más estudiada es la mitad occidental, desde Andalucía (Sánchez-España, 2004) hasta Túnez (Sellem y Guillou, 2007) pasando por Cataluña (Lozano *et al*, 1995), Marsella (Fenaux, 1968), Italia (Barbaglio *et al*, 2007) y Argelia (Guettaf, 1997).

Ourens (2007) realizó un interesante trabajo de recopilación bibliográfica de todos los estudios que han analizado el ciclo reproductivo de *P. lividus*, estandarizando los distintos índices empleados por los autores seleccionados, para después poder comparar los distintos valores del índice gonadal (I.G.). Una de las ideas más claras que refuerza este trabajo es la diferencia que existe entre los valores del I.G. y las estrategias reproductivas en el Atlántico, (con valores altos del índice y un único periodo de puesta) y las del Mediterráneo (con valores bajos y una o dos puestas en función de que estudio se analice). En general los estudios realizados en el Atlántico describen un único periodo de puesta que comienza en los meses de abril y mayo y termina en los meses de julio o agosto, si bien la longitud de la época de puesta varía bastante entre poblaciones. (Byrne, 1990; Haya de la Sierra, 1990; Catoira; 1995; Spirlet *et al*, 1998; Bayed *et al*, 2005). Además, existen algunas excepciones, como el ciclo gonadal descrito por Crapp y Willis (1975) en poblaciones de intermareal de la costa de Irlanda en el que el I.G.

comienza a descender en el mes de enero, o la puesta observada en Canarias (Girad *et al*, 2006), con un periodo de puesta durante el invierno.

En el Mediterráneo existen en términos generales dos estrategias reproductivas principales, descritas con pequeñas variaciones por la mayoría de autores. La primera consiste en un único periodo de puesta que comenzaría en primavera y se extendería hasta el verano (Lozano *et al*, 1995; Sánchez España *et al*, 2004; Sellem y Guillou, 2007), de manera similar a como ocurre en las poblaciones atlánticas. La segunda estrategia consiste en dos puestas por año (Fenaux, 1968; Fenaux y Pedrotti, 1992; Pedrotti, 1993; Fernández y Boudouresque, 1997; Guettaf, 1997; Barbaglio *et al*, 2007) en primavera y otoño. No obstante, hasta tres estrategias reproductivas han sido observadas en poblaciones mediterráneas de *P. lividus* en la costa de Argelia (Guettaf, 1997), con erizos maduros durante todo el año (Guettaf, 1997; Sánchez-España, 2004), lo que da una idea de la gran variedad de respuestas que puede desarrollar esta especie de equinodermo en función de las condiciones ambientales.

Debido a esto, aún son muchas las cuestiones poco entendidas en el ciclo gonadal del erizo de mar, existiendo cierta controversia sobre algunos temas como la existencia de segundas puestas en algunas zonas del Mediterráneo, el papel de los factores ambientales en el control del ciclo gonadal o la existencia e identidad de desencadenantes ambientales de la puesta.



Figura 3.1.1. En la imagen se observa un ejemplar de *P. lividus* de color verde extraído en la cala de Islares realizando la puesta. Se trata de un macho, como se deduce del color blanco de sus gametos. Foto: Pedro Agustín.

Además de la gran versatilidad de *P. lividus*, existen otras causas que contribuyen a generar incertidumbres sobre el ciclo reproductivo de *P. lividus*. El peso de la gónada se ve afectado por procesos no relacionados con la reproducción, al ser también un órgano

de reserva, por lo que las variaciones del índice pueden ser engañosas y deben ser interpretadas con mucha precaución si no van acompañadas de un análisis histológico de la gónada. A pesar de ello, aún son pocos los trabajos que incluyen cortes histológicos en los estudios del ciclo gonadal y en la actualidad tan solo una pequeña parte de la bibliografía existente incluye este tipo de estudios (Fenaux, 1968; Byrne, 1990; Haya de la Sierra, 1990; Lozano *et al*, 1995; Guettaf, 1997; Spirlet *et al*, 1998; Sánchez-España, 2004, Barbaglio *et al*, 2007; Sellem y Guillou, 2007).

Respecto al papel de los factores ambientales en el control del ciclo gonadal, la falta de estudios específicos es notable, siendo muy pocos autores los que tratan de relacionar la variación del ciclo gonadal con las condiciones oceanográficas de la zona de estudio. Esta falta de estudios se ha paliado en parte en los últimos años con la aparición de algunos trabajos que han analizado el papel de los factores ambientales en el ciclo gonadal de *P. lividus* mediante experimentos de laboratorio. (Spirlet *et al*, 2000; Sphigel *et al*, 2003), si bien aún quedan importantes incógnitas sobre este control ambiental, con contradicciones entre los distintos estudios realizados.

Por último, hasta la fecha no se han desarrollado trabajos específicos que traten de determinar cuáles son si es que los hay los desencadenantes ambientales de la puesta. Además, la gran adaptabilidad de esta especie y el elevado número de estrategias reproductivas que exhibe hace muy difícil el extrapolar los resultados de regiones alejadas geográficamente y la comparación entre estudios de regiones con condiciones oceanográficas muy distintas no siempre es sencilla.

El ciclo gonadal de *P. lividus* en el Mar Cantábrico ha sido muy poco estudiado. Tan solo existe un trabajo previo realizado en las costas de Asturias y solo en poblaciones de intermareal (Haya de la Sierra, 1990), por lo que el estudio del ciclo gonadal de *P. lividus* en esta zona del Golfo de Vizcaya resulta de gran interés, tanto como contribución general al conocimiento de la especie, como de cara a su posible explotación comercial en Cantabria.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio del ciclo gonadal comenzó en mayo del 2004 y se extendió hasta septiembre del 2005. Para la realización de este estudio se eligieron tres estaciones de muestreo situadas a lo largo del litoral cántabro, desde su lado occidental hasta su límite oriental.

El nombre, la posición y las coordenadas de las tres estaciones se muestran en la figura 3.2.1.

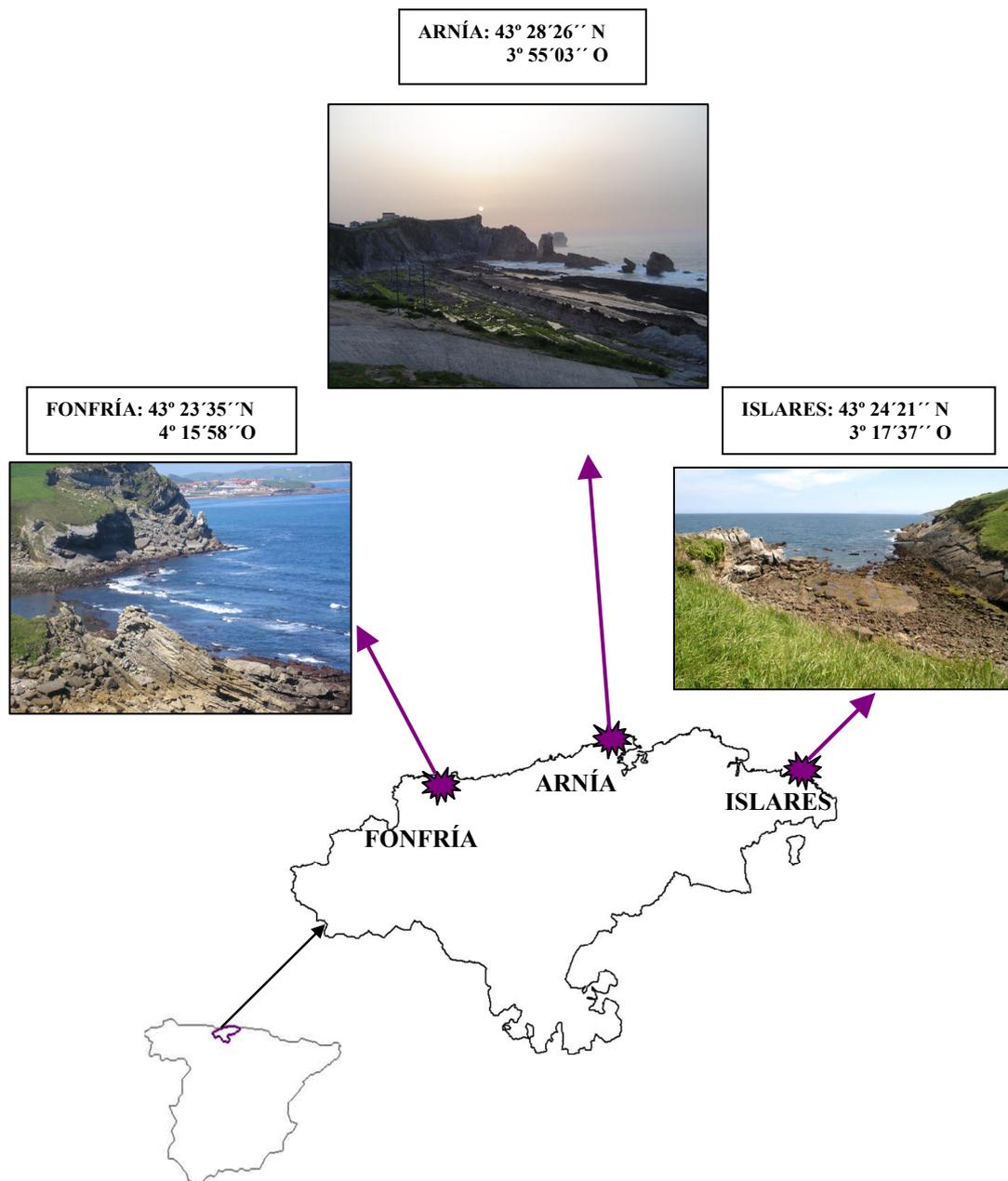


Figura 3.2.1. Distribuciones de las estaciones de muestreo en el litoral de Cantabria

Cada una de las tres estaciones presenta grandes poblaciones de *P. lividus* que se extienden desde la franja intermareal, donde los erizos se encuentran en charcos de marea, hasta los primeros metros de la zona submareal. Esta gran variabilidad de hábitats que ocupan los erizos de mar fue aprovechada para testar el efecto del hábitat en su ciclo gonadal. Para ello se dividió cada estación de muestreo en dos, hábitat intermareal (que engloba a los charcos de marea) y hábitat submareal (que haría referencia a fondos someros de sustrato duro) y se muestreó en ambos en todas las localidades, excepto en Arnía donde los erizos de submareal no pudieron muestrearse debido al gran oleaje presente en la zona.

Aunque los erizos de submareal e intermareal de las mismas localidades probablemente sean parte de la misma población, en el sentido estricto del término, en esta tesis doctoral nos vamos a referir a cada uno de los grupos de erizos de un hábitat y localidad como una población.

Se ha empleado este término por lo tanto de manera no estricta, para referirnos a erizos que habitan zonas sometidas a idénticas condiciones ambientales y no hemos tenido en cuenta características de tipo genético o reproductivo.

3.2.1. ESTACIONES DE MUESTREO

3.2.1.1. Islares

La estación de muestreo de Islares se encuentra situada en una pequeña ensenada conocida como *La Cotonera*. Se trata de una pequeña hendidura en la costa, orientada al este cerca de la playa de Oriñón. La línea de costa en esta zona es abierta y está muy expuesta al oleaje, que rompe con fuerza contra los acantilados rocosos. Se encuentra situada a los pies del monte *Cerredo* y en las inmediaciones de un pequeño islote que recibe el mismo nombre que la cala, *La Cotonera*.

La zona supramareal está compuesta por grandes rocas fragmentadas y cantos rodados que en algunas zonas son utilizadas por las gentes de lugar para tomar el sol o bañarse. Esta actividad recreacional, se une a la de los pescadores deportivos que bien con caña o bien mediante pesca sub-marina utilizan de manera frecuente la zona.

La zona intermareal está repleta de charcos de marea de varios tamaños y a muchas alturas. Gran parte de estos charcos presentan poblaciones importantes de *P. lividus* de pequeño tamaño, formando agregados de densidades moderadas (Figura 3.2.1.2). De las tres poblaciones de intermareal, la de Islares es la población con mayor diversidad de charcos. En esta cala hay desde charcos pequeños y alejados de la zona submareal, hasta charcos grandes y muy cerca del nivel submareal. En general todos los charcos de marea se encuentran protegidos de la acción directa del oleaje por la propia cala que forma una barrera natural contra el oleaje.

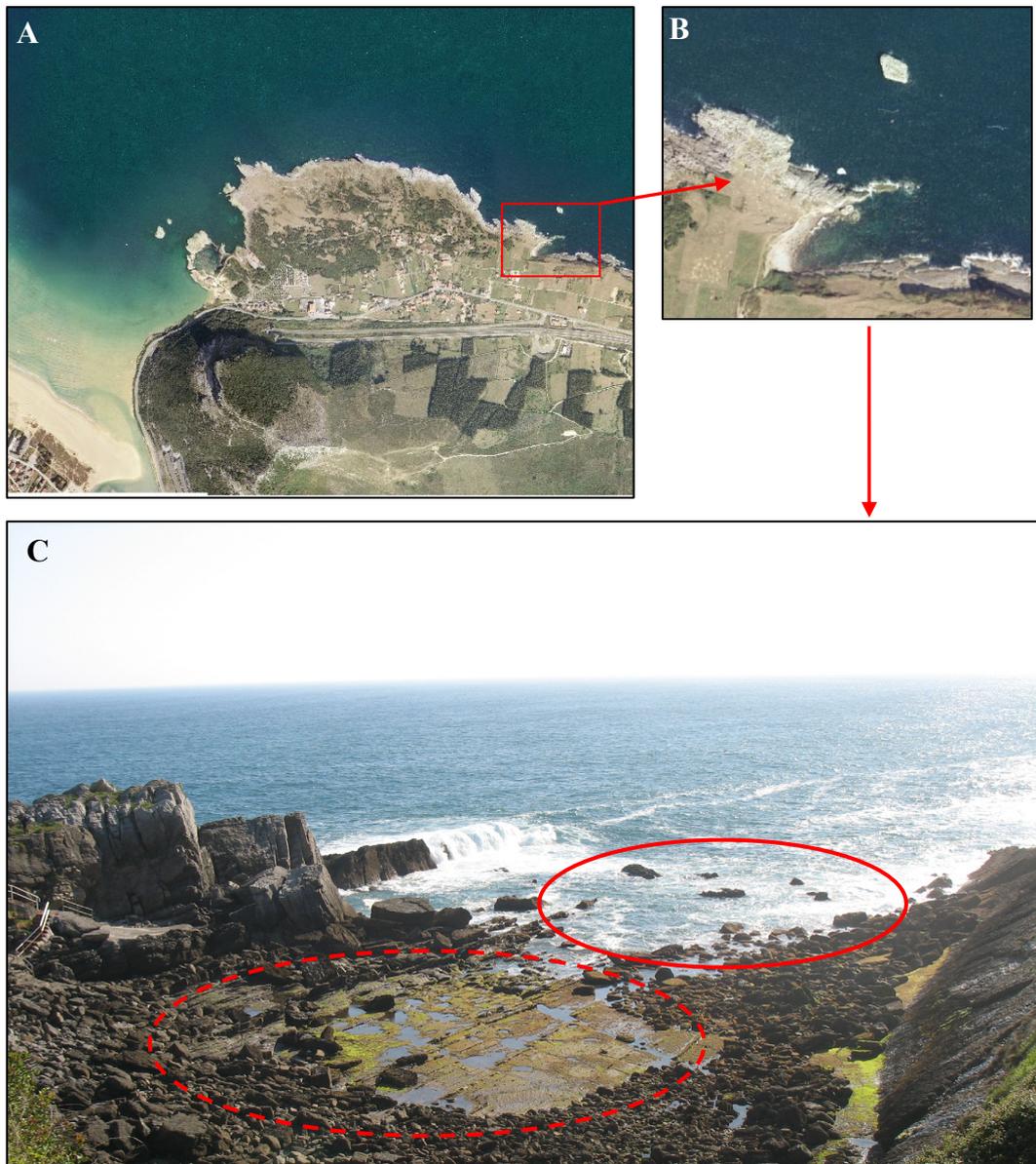


Figura 3.2.1.1. Situación de la cala de *La Cotonera*. A) Imagen aérea de la zona este de la Playa de Oriñon, en la que se aprecia la cala de la Cotonera en un rectángulo de color rojo. B) Perspectiva aérea de la zona de estudio. C) Imagen panorámica de la cala en la que se observan los charcos de marea (círculo de línea discontinua) y la zona submareal (círculo de línea continua).

Además de erizos, estos charcos están habitados por la anémona *Anemonia sulcata*; (Risso, 1826) y ofiuras de la especie *Amphipholis squamata* (delle Chiaje, 1829) muy abundantes debajo y entre las espinas de los erizos. Las coralinas son abundantes, así como el alga incrustante *Lithophyllum incrustans* Philippi.



Figura 3.2.1.2. Imagen típica de un charco de marea en la cala de Islares. Los erizos comparten el espacio con las anémonas y algas del género *Corallina* que dan un aspecto rosado al charco. Foto: Pedro Agustín.

La mayor parte de los charcos muestreados en Islares presentan una escasa profundidad (Figura 3.2.1.2) y en su mayoría se encuentran cerca del nivel mínimo de la bajamar, por lo que pasan poco tiempo emergidos, si bien existe una zona de charcos en la zona más cercana a las escaleras de acceso situados en una zona elevada. Estos charcos permanecen un mayor tiempo emergidos, presentan profundidades mayores y son los responsables de la diversidad de charcos presentes en Islares.

La zona submareal muestreada se corresponde a la zona interior de la hendidura que forma la cala de la Cotonera. Se trata de un área de unos 200 m² (20 x 10 m) con un leve desnivel, que alcanza a los 4-5 metros por debajo del nivel del mar en su zona más profunda. Se trata de una zona batida, pese a estar ligeramente resguardada de la acción directa del oleaje (Figura 3.2.1.1). Los erizos se encuentran presentes por todo el fondo y compiten por el espacio con las anémonas que también son muy abundantes, dominando en las grietas y hendiduras que les ofrecen un mejor agarre para protegerse

de la actividad del oleaje y evitar ser arrancados. Aunque son abundantes no llegan a formar eriales de erizos y salvo en las hendiduras y en los laterales de las grandes rocas donde presentan agrupaciones de densidad elevada, aparecen dispersos por todo el fondo calizo.

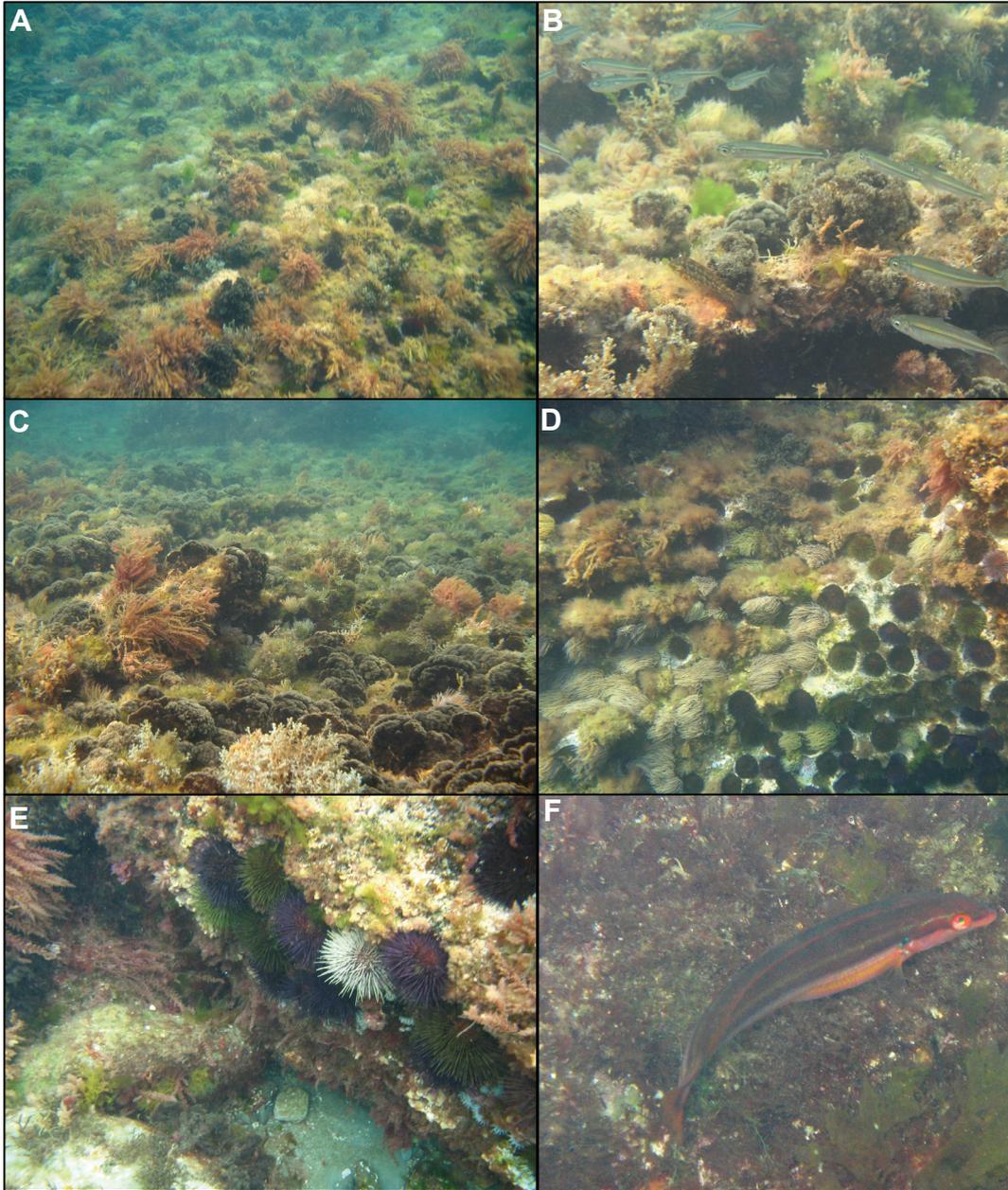


Figura 3.2.1.3. Mosaico de fotografías sacadas en la cala de Islares en el mes de junio. A y C) Fotos del fondo de la cala en el que se aprecia la presencia de las algas: *Halopteris scoparia* (Linneus) Sauvageau, *Asparagopsis armata* Harvey y *Cystoseira* sp. entre otras. Hay que tener en cuenta que las fotos fueron sacadas en una época de presencia máxima de algas, en general el fondo aparece mucho menos recubierto y los erizos y anémonas se hacen mucho más evidentes. B y F) Imagen de algunas de las especies de ictiofauna presentes en la zona. D y E) Imágenes sacadas en las zonas laterales de algunas de las grandes rocas presentes en el área de estudio. Estas zonas presentaban las densidades mayores de erizos así como los ejemplares de mayor porte.

3.2.1.2. Arnía

La localidad de Arnía se encuentra situada a escasos kilómetros al Oeste de la ciudad de Santander en una zona de la costa cántabra conocida como *Costa Quebrada* por la abundante presencia de farallones rocosos como los que se observan en la imagen de la Figura 3.2.1.5. Esta zona, presenta una alineación SO/NE y es una zona muy batida por el oleaje, lo que imposibilitó el muestreo de los fondos infralitorales.

No obstante, presenta una gran superficie de intermareal con abundantes charcos de marea de gran tamaño que albergan densas poblaciones de *P. lividus*. La cala de Arnía presenta una gran rasa intermareal que queda sumergida en los momentos de máxima pleamar, pero que permanece emergida el resto del tiempo formando una gran zona de charcos de marea de diversos tamaños y profundidades, pero con gran densidad de *P. lividus* en todos los casos. Esta zona se encuentra muy resguardada de la acción directa del oleaje que choca con fuerza contra los farallones rocosos de la zona externa antes de alcanzar la rasa de marea, por lo que se puede decir que el hidrodinamismo en la zona de los charcos es bajo.

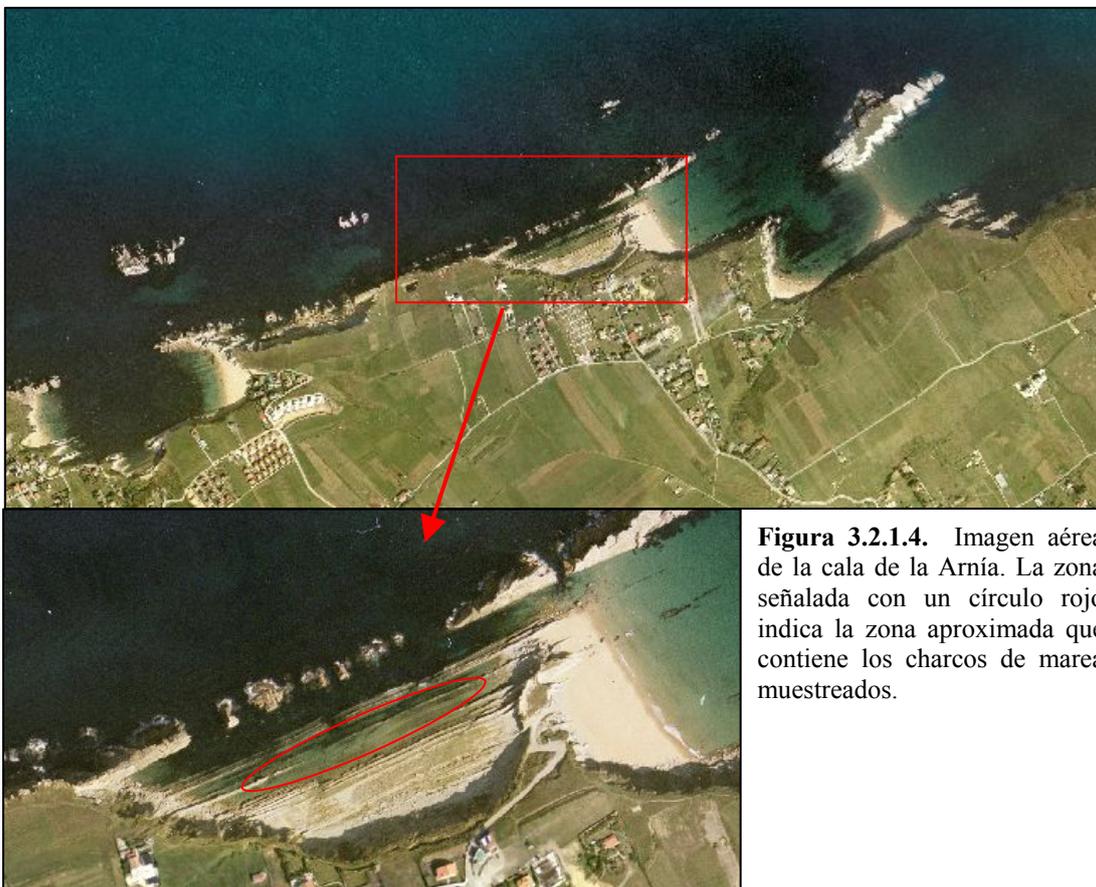


Figura 3.2.1.4. Imagen aérea de la cala de la Arnía. La zona señalada con un círculo rojo indica la zona aproximada que contiene los charcos de marea muestreados.



Figura 3.2.1.5. Imagen panorámica de la cala de la Arnía durante la bajamar. La zona señalada con un círculo rojo presenta los principales charcos muestreados.

En esta cala se encuentra el charco de marea más grande de los muestreados en este estudio (Figura 3.2.1.7 A), con una longitud de más de 12 metros, una anchura máxima de más 2 metros y una profundidad máxima también de unos 2 metros.

Además, gran parte de la superficie de la rasa queda sumergida por una capa de agua, que en su zona menos profunda apenas presenta unos centímetros de grosor, pero que alberga numerosas zonas con profundidades de entre 20 y 50 cm (Figura 3.2.1.7 B) en la que es posible encontrar erizos en densidades bajas.

Aunque el mayor número de erizos presentes en la Arnía se encuentra dentro del gran charco, los erizos de los múltiples charcos pequeños que hay a lo largo de toda la rasa son mucho más accesibles, por lo que fue en estos charcos de donde se extrajeron gran parte de los erizos muestreados.

A pesar de que los charcos de Arnía presentan diferencias importantes con los charcos de Islares en cuanto a tiempo de emersión (muy superior en los charcos de Arnía a lo observado en Islares), tamaño, profundidad, densidad de erizos, etc., el aspecto de los charcos en ambas localidades es muy similar, encontrándose dominados por algas del género *Corallina*, anémonas y por supuesto erizos.



Figura 3.2.1.6. Imagen de la zona de estudio en la que se aprecian las dos zonas principales para la extracción de erizos. En la zona de la izquierda se encuentra el charco más grande de todos los muestreados, mientras que la zona de la derecha alberga multitud de pequeños charcos con profundidades máximas de 40 cm unidos entre sí por una fina capa de agua.

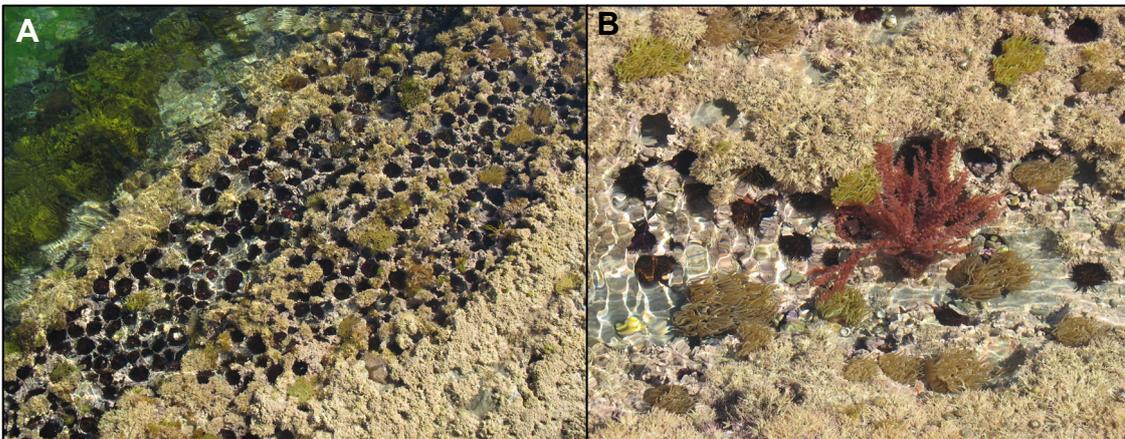


Figura 3.2.1.7. A) Imagen del gran charco presente en la cala de Arnía. En la foto se observa la gran profundidad del charco, que facilita la presencia de macroalgas en su zona más profunda, así como la elevada densidad de erizos de pequeño tamaño presentes en la zona lateral de menor profundidad. En las zonas más profundas se encontraban erizos de gran tamaño para un charco de marea (>50 mm). B) Imagen de uno de los múltiples pequeños charcos presentes en Arnía. En la imagen se observa la escasa profundidad (difícilmente superará los 30 cm, así como la presencia de algas del género *Corallina* y de la anémona *Anemonia sulcata*).

3.2.1.3. Fonfría

La ensenada de Fonfría se encuentra situada a menos de 1 km al este del pueblo de Comillas, en la zona occidental de Cantabria. Se trata de una profunda hendidura en la costa, con forma de V, con unos 100 metros de largo y entre 15 y 50 metros de anchura (en función de la zona de ensenada donde se mida). En el comienzo de la ensenada se encuentra una explotación de acuicultura, que se dedica al cultivo del Rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y que vierte sus residuos directamente a través de dos sumideros a la ensenada de Fonfría (Figura 3.2.1.9 A).



Figura 3.2.1.8. A) Imagen aérea de la ensenada de Fonfria (cuadrado rojo) al este del pueblo y la playa de Comillas, en la zona izquierda de la imagen. B) Imagen en detalle de la ensenada. C) Imagen panorámica de la zona exterior de la ensenada. En las imágenes B y C, los círculos rojos indican las zonas de muestreo; Submareal (línea continua) e Intermareal (línea discontinua), mientras que el círculo azul señala la posición de la piscifactoría de Rodaballo.

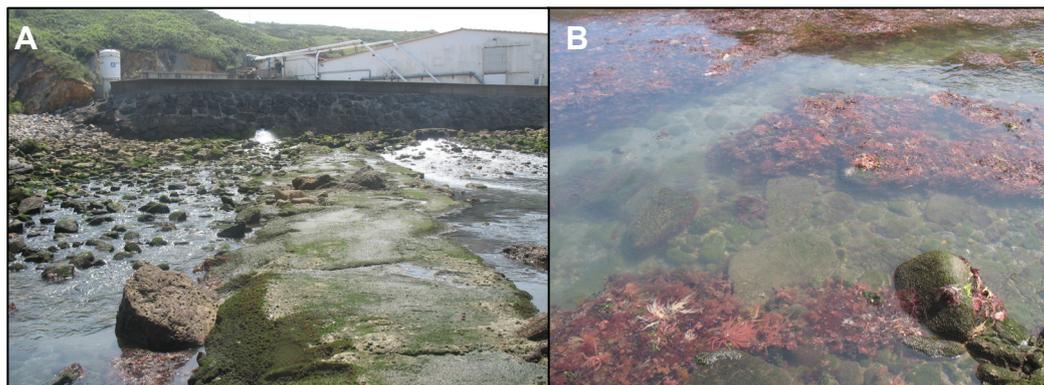


Figura 3.2.1.9. A) Imagen del vertido procedente de la piscifactoría de Rodaballo (*Scophthalmus maximus*). B) Imagen de la elevada presencia del alga roja *Asparagopsis armata* en la zona de vertido.

La presencia de este vertido muy probablemente esté relacionada con la elevada cobertura algal presente en toda la zona, muy elevada como se observa en la Figura 3.2.1.9 B.

Los erizos del hábitat intermareal se encuentran en la zona más externa de la ensenada, directamente expuestos al oleaje y profundamente encovados, en charcos de marea situados sobre unas grandes rocas que solo emergen durante las horas de máxima bajamar. En su mayoría se trata de pequeños charcos de escasa profundidad que albergan grupos pequeños de erizos (como consecuencia del escaso tamaño de los charcos) aunque densamente agrupados. Los charcos de Fonfría intermareal presentan una mayor cobertura algal por parte de algas del género *Corallina* y una menor presencia de anémonas a la observada en las otras dos poblaciones de intermareal.

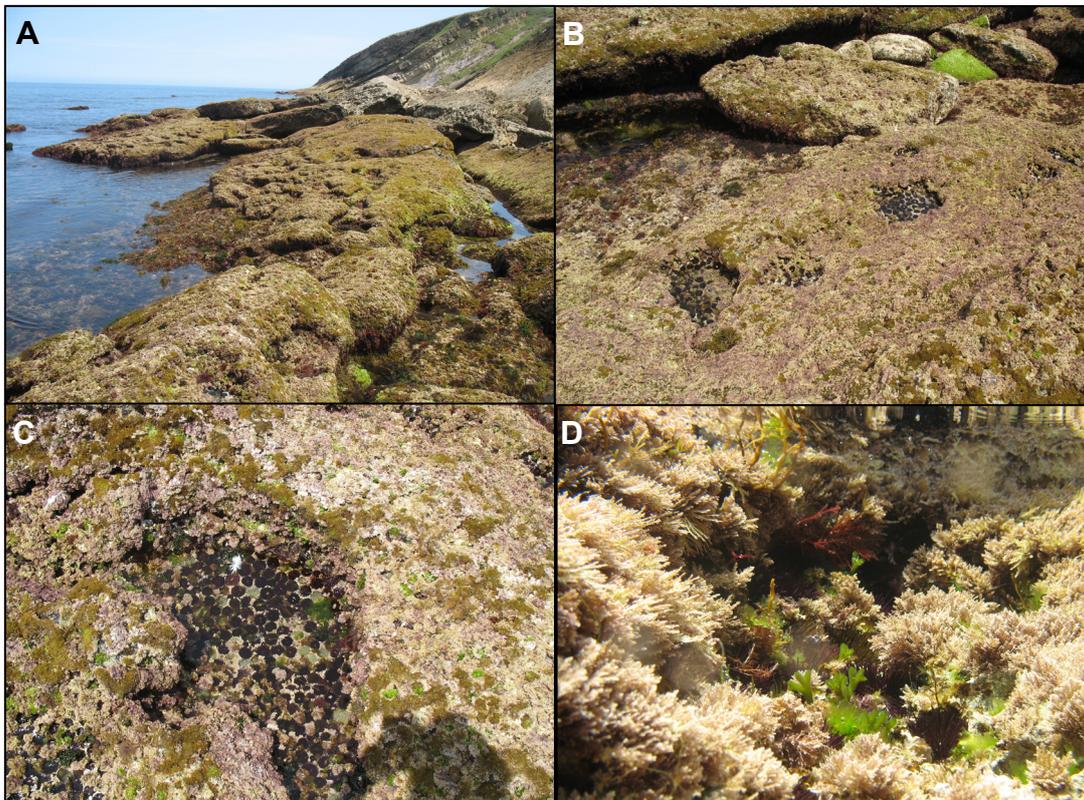


Figura 3.2.1.10. A) Imagen de la zona de charcos en Fonfría intermareal. B) Charcos de pequeño tamaño y escasa profundidad, típicos en la zona de estudio. C) Imagen de uno de los charcos más grandes de toda la zona de estudio. D) Imagen subacuática de los erizos en uno de los charcos de Fonfría. Como se observa en la imagen a pesar de la elevada densidad, la disponibilidad de alimento es elevada, gracias a las algas de arribazón y a la elevada cobertura algal, principalmente del género *Corallina*.

Los erizos de la zona submareal se encuentran en la zona final de la ensenada, repartidos por todo el fondo en densos agregados rodeados de una densa cobertura algal. Se trata en general de erizos de gran tamaño (> 60 mm), que habitan fondos rocosos someros dominados por densas coberturas de macroalgas que rodean sus agregados. Las algas más abundantes en la zona de estudio son: *Gelidium* sp. y en menor medida:

Asparagopsis armata Harvey, *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau y *Cystoseira* sp, aunque en los meses estivales también son abundantes las algas verdes como *Ulva lactuca* Linnaeus o *Codium tomentosum* Stackhouse.

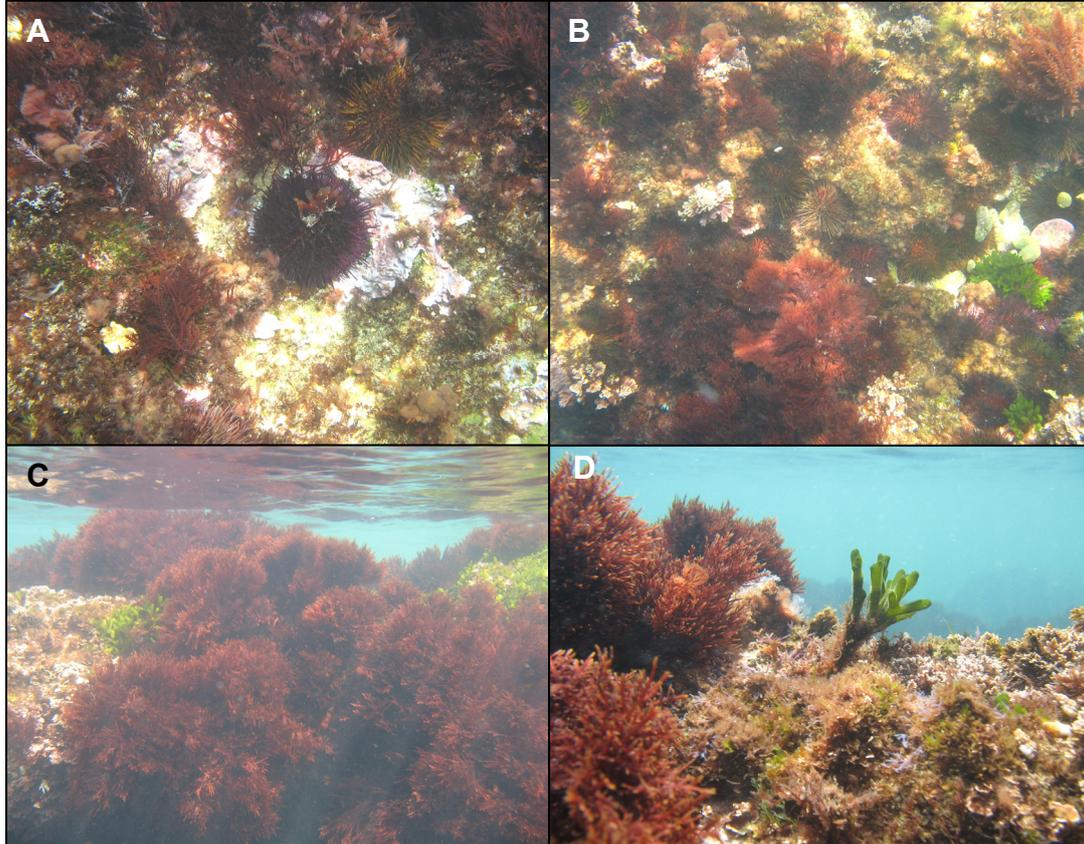


Figura 3.2.1.11. Mosaico de imágenes que muestran el tipo de hábitat en el que se encuentran los erizos de Fonfria submareal. A) Dos erizos cubiertos por trozos de alga (en su habitual comportamiento de cobertura) rodeados de algas del genero *Gelidium*. B) Agregado de erizos rodeado de *Gelidium*, *Codium tomentosum* y un ejemplar de *Asparagopsis armata*. C) Foto en la que se observa la elevada cobertura algal, con zonas totalmente cubiertas por *Gelidium* sp. D) Imagen de un ejemplar aislado de *Codium tomentosum*.

El hidrodinamismo en la zona es moderado, siendo relativamente bajo en las poblaciones situadas en la zona más interna de la ensenada e incrementándose a media que salimos hacia el exterior.

Además de erizos y algas, la zona también presenta una elevada densidad de peces, que atraídos por la materia orgánica presente en las aguas del vertido de la piscifactoría se agolpan en sus inmediaciones formando densos cardúmenes. Principalmente, se trata de *mubles* (*Mugil cephalus*) que entran en la ensenada al subir la marea, si bien también es posible observar a otras especies formando bancos como *Sarpa salpa* (Linnaeus, 1758).

Además, también son abundantes otras especies de peces como: *Coris julis*, *Labrus bergylta* o *Symphodus melops* (Linnaeus, 1758).



Figura 3.2.1.12. A) Imagen de varios ejemplares de *Coris julis* de gran tamaño en la zona de estudio. B) Cardumen de *Sarpa salpa* tras entrar en la ensenada con la pleamar para alimentarse del vertido de la piscifactoría.

Con el objeto de resumir las características principales de las cinco poblaciones muestreadas se ha procedido a crear la Tabla 3.2.1.1, en la que se muestra el valor de algunas de las principales variables secundarias asociadas a la zona de estudio con efecto sobre el ciclo gonadal.

Localidad	Islares		Fonfría		Arnía
Hábitat	Submareal	Intermareal	Submareal	Intermareal	Intermareal
Exposición al oleaje.	Alta	Media	Media	Alta	Baja
Densidad	Media	Media	Baja	Alta	Media
Cobertura algal	Media	Media	Alta	Alta	Media
Tiempo de emersión		Medio		Bajo	Alto

Tabla 3.2.1.1. Estimación del valor de algunas de las principales variables con efecto en el ciclo gonadal asociadas a la zona de muestreo.

3.2.2 METODOLOGÍA DE MUESTREO

Los muestreos se realizaron con una periodicidad mensual durante las dos últimas semanas de cada mes, siempre durante la bajamar y con coeficientes de marea altos para facilitar la recolección de los ejemplares de intermareal, especialmente en el caso de los charcos situados en Fonfría, que se encuentran muy cerca de la zona de rompiente, lo que hacía peligroso trabajar con mareas que no fuesen vivas.

La recolección de los ejemplares comenzó en mayo de 2004 y se extendió de manera continua hasta septiembre de 2005, si bien en el mes de octubre de 2004 no se pudo muestrear en las poblaciones de submareal. Además del mes de octubre, tampoco se muestreó en el mes de mayo del 2004 en la población de Fonfría intermareal y en junio de 2004 en Arnía.

Todos los muestreos se realizaban de manera consecutiva, para evitar que existiesen diferencias cronológicas importantes entre los muestreos de las distintas poblaciones y nunca hubo más de cuatro días de diferencia entre los distintos muestreos.

La captura de los erizos se hacía con la ayuda de un cuchillo para facilitar su extracción, ya que en algunos casos (especialmente en Fonfría intermareal) esta extracción era dificultosa, al estar los erizos profundamente encovados y firmemente sujetos. En ocasiones se producía la ruptura del caparazón, obligando a descartar al individuo. Los erizos de intermareal se muestreaban a pie, mientras que en el caso de los erizos situados en el nivel submareal, eran capturados buceando a pulmón libre.

Aunque lo ideal hubiera sido capturar erizos de diámetros iguales en todas las poblaciones muestreadas, hubo que establecer dos clases de talla por la ausencia de erizos de tallas grandes en las poblaciones de intermareal y la dificultad de capturar tallas pequeñas en las poblaciones de submareal. En los charcos de marea se muestrearon erizos con diámetros superiores a los 28 mm e inferiores a los 43 mm, mientras que en las poblaciones submareales el rango fue de entre 50 y 70 mm aproximadamente.

En cada población se extraían un mínimo de 15 erizos, lo que hacía un total de 75 erizos por mes y más de 1.250 erizos muestreados a lo largo del periodo de estudio. Una vez capturados, los erizos eran llevados al laboratorio para su tratamiento, tratando de reducir al máximo el tiempo entre su captura y su procesamiento para evitar las puestas espontáneas que se producen en algunos erizos tras su captura. Además de extraer los erizos para establecer su estado gonadal, durante los muestreos se medía la temperatura *in situ*, tanto en la columna de agua como en los charcos de marea.

Por último, se recogían muestras de agua tanto de las poblaciones submareales como de los charcos de marea con botellas de plástico opacas de 5L de capacidad, para la medición de la concentración de clorofila.

3.2.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.2.3.1. Extracción de las gónadas

Los erizos muestreados se transportaban al laboratorio donde se procedía a su tratamiento, inmediatamente después de su captura. La Figura 3.2.3.1 muestra cuatro fotografías en las que se observan algunos de los pasos de la extracción de las gónadas.

El análisis de los individuos capturados comenzaba con su medición tanto en diámetro como en altura, con la ayuda de un calibre *Vernier*. Una vez medidos, los erizos eran abiertos por la mitad con ayuda de unas tijeras. Se abrían cortando por las placas ambulacrales, para evitar en la medida de lo posible dañar el tejido gonadal. Tras esto se les extraía el agua contenida en su cavidad interna y se dejaban secar durante cinco minutos en papel secante, con las partes internas hacia abajo.

Una vez abiertos, se procedía a la extracción de las gónadas, con la ayuda de unas pinzas y se clasificaban por sexos en función del color del tejido gonadal: cuando los erizos están maduros, las gónadas de las hembras son de un color naranja intenso y las de los machos presentan un color pálido, casi blanco. Sin embargo, cuando los erizos no están maduros esta separación puede ser complicada, especialmente en el caso de los erizos de tallas menores. Cuando la clasificación no fue posible el sexo del erizo de clasificó como indeterminado.

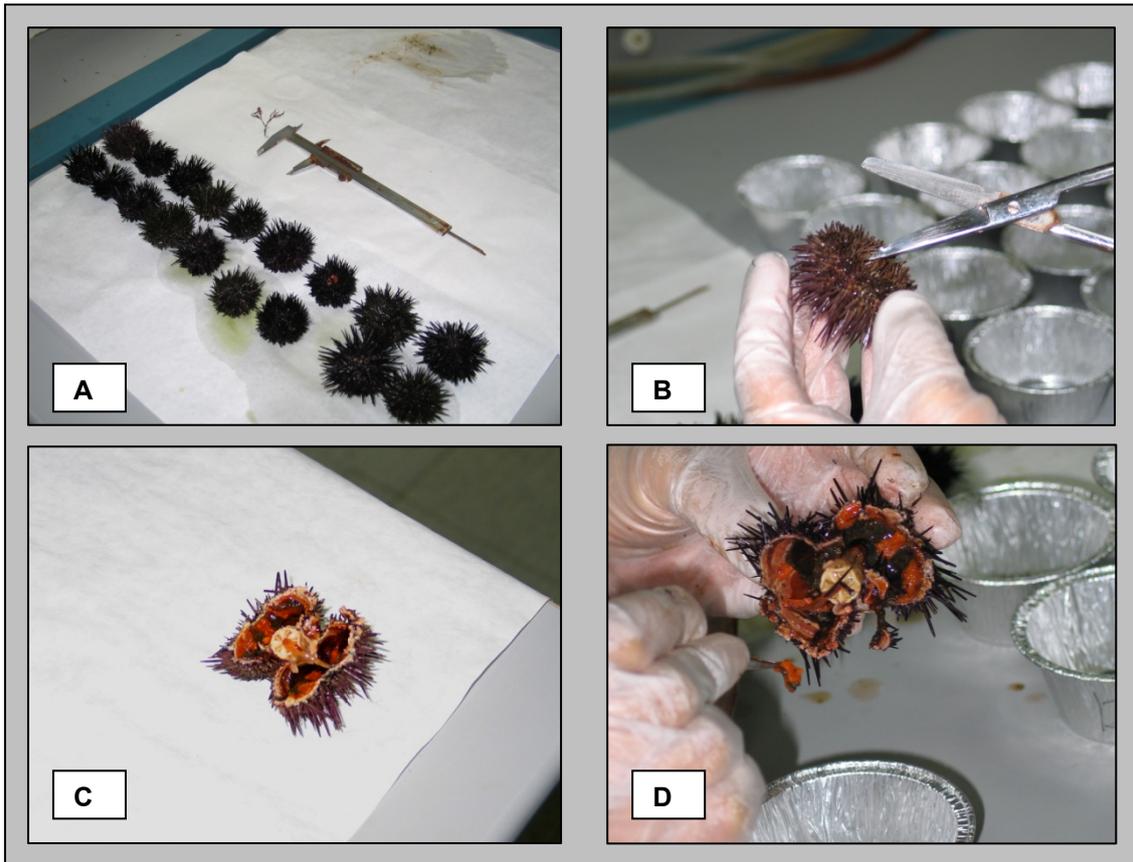


Figura 3.2.3.1. Conjunto de fotografías en las que se observa las distintas fases de tratamiento de los erizos muestreados, desde su medición con ayuda de un calibre Vernier (Foto A) hasta la extracción de las gónadas (Foto D), pasando por su apertura (Foto B) y el secado en papel de filtro (Foto C). Obsérvese que el erizo abierto es una hembra, como se deduce del color naranja de sus gónadas.

Tras separar las gónadas y sexar a los erizos se procedía a pesar las cinco gónadas y el resto del cuerpo del erizo por separado (en una balanza *SARTORIUS* L420P como la que se observa en la Figura 3.2.3.2) con una precisión de centésima de gramo.



Figura 3.2.3.2. En la imagen puede observarse una de las bandejas de aluminio utilizadas como recipientes en la desecación de las gónadas pesándose en la balanza *SARTORIUS* modelo L420P

Una vez obtenido el peso húmedo, se extraía una pequeña fracción de gónada de un mínimo de cinco hembras por población, para la realización de los cortes histológicos y después se volvían a pesar las gónadas para calcular el porcentaje de gónada extraído.

Los fragmentos de gónada extraídos se colocaban en gradillas de plástico (tal y como se observa en la Figura 3.2.3.3) y se congelaban para su posterior tratamiento histológico. Solo se utilizaron hembras en la realización de los cortes histológicos porque se partió de la base de que hembras y machos maduran de manera simultánea (Byrne, 1990; Lozano *et al*, 1995; Guettaf, 1997, Spirlet *et al* 1998).



Figura 3.2.3.3. Gradillas plásticas con fragmentos de gónada empleadas para la conservación de las gónadas y la realización de los bloques de parafina utilizados en los cortes histológicos.

Por último, se procedía a secar las gónadas y el resto del cuerpo en una estufa a 120 °C durante 48 horas para obtener los pesos secos de gónadas y cuerpo.

3.2.4. TRATAMIENTO HISTOLÓGICO

Los fragmentos de gónada extraídos para su análisis histológico se descongelaban y se introducían en líquido de Bouin para su fijación. El líquido de Bouin es un fijador muy utilizado en el análisis histológico de invertebrados, así como en otros trabajos realizados en *P. lividus* (Byrne, 1990; Guettaf, 1997; Sellem y Guillou, 2007).

El fragmento extraído se mantenía inmerso en el fijador entre 3 y 4 días en función de su estado. Tras esto se lavaba con alcohol al setenta por ciento para eliminar los restos del fijador sobrantes. Después, se sometía al fragmento de gónada a un proceso de deshidratación mediante baños consecutivos de diez minutos en concentraciones crecientes de alcohol.

Una vez el tejido había sido fijado y deshidratado, se procedía a su inclusión en Parafina líquida. La parafina se mantenía en una estufa a 60 °C para conseguir su estado líquido y las gradillas de plástico con el tejido en su interior (Figura 3.2.3.3) eran introducidas en la parafina líquida. Se realizan dos baños de una hora y por último se deja solidificar el matraz fuera de la estufa, a temperatura ambiente.

Tras la solidificación, los fragmentos de tejido se transportaban en forma de bloques de parafina al Dpto. de Biología Celular e Histología, en la Facultad de Medicina de la Universidad el País Vasco, para la realización de los cortes histológicos y su tinción.

En estos laboratorios se volvía a licuar la parafina para la extracción de las gradillas plásticas que contenían los fragmentos de gónada y se procedía a elaborar los bloques en los que después se realizarían los cortes histológicos, con ayuda de un dispensador de parafina de la casa *SHANDON*, modelo *HISTOCENTRE 2* (Figura 3.2.4.1).

Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo de precisión de la casa *SHANDON*, modelo *AS325* que puede observarse en la Figura 3.2.4.2.

Se realizaban varios cortes por cada fragmento de gónada para asegurar la correcta observación del estado gonadal. En total se realizaron más de 500 preparaciones histológicas. El grosor de los cortes era de 7 µm.

Una vez se había realizado el corte histológico se procedía a realizar el último paso antes de su observación al microscopio; la tinción. Para ello, los cortes histológicos se introducían en una batería de tinción (Figura 3.2.4.3) en la que se bañaba la muestra en citrosol, en dos baños de cinco minutos.



Figura 3.2.4.1. Dispensador de parafina de la casa SHANDON, modelo HISTOCENTRE 2.



Figura 3.2.4.2. Micrótopo de la casa SHANDON modelo AS325 empleado en la realización de los cortes histológicos.

Seguidamente se pasaba a una batería de baños en alcohol de cinco minutos de duración y de concentración decreciente, para posteriormente introducir la muestra en el colorante. En primer lugar se procedía a bañar las gónadas en hematoxilina, durante cuatro minutos y tras retirar los restos de colorante mediante un baño con agua destilada se introducían en eosina durante unos 30 segundos.

Posteriormente, los baños de alcohol se repetían, aunque esta vez en concentraciones crecientes. Tras esto, las muestras de gónada se volvían a introducir en citrosol, en dos baños de cinco minutos cada uno.



Figura 3.2.4.3. Batería de tinción de Hematoxilina-eosina.

Por último, los cortes histológicos se dejaban secar y se les añadía un cubre que se fijaba con Xilol. Una vez realizado este último paso los cortes histológicos estaban listos para su observación al microscopio.

3.2.5. ÍNDICES GONADALES

El índice gonadal (I.G) es una herramienta que relaciona el peso de las gónadas con el peso o el volumen del cuerpo. El estudio de su evolución a lo largo de un año da información valiosa sobre el estado de las gónadas, relacionándose un descenso del mismo con la puesta. Los autores que han empleado este tipo de índices en el estudio de los ciclos reproductivos de los equinoideos son muy numerosos (Tabla 3.2.5.1). Solo en *P. lividus*, Ourens (2007) recopiló trabajos de más de 25 autores que empleaban algún tipo de índice gonadal o gonadosomático. Sin embargo, el empleo exclusivo de índices gonadales puede generar errores de interpretación, debido a que existen otras variables que afectan al valor del índice y que no están relacionadas con la reproducción.

Por esta razón, es necesario ser muy cauteloso a la hora de interpretar resultados que solo empleen el índice gonadal como herramienta de estudio (Lozano *et al*, 1995), siendo muy recomendable el empleo de varios métodos de manera conjunta (Spirlet *et al*, 1998).

Existen muchos tipos de I.G. diferentes en la bibliografía que, aunque mantienen un mismo objetivo: relacionar la producción gonadal con la del resto del cuerpo, lo hacen de maneras muy diversas.

El primer autor que empleó el I.G. en equinoideos fue Moore (1934). Este autor (citado en Guettaf, 1997) empleó el siguiente índice gonadal:

1. $IG = [\text{Volumen de la gónada (ml)} / \text{Volumen total del erizo (ml)}] * 100$

La estimación de volúmenes es más compleja que el cálculo de masas y está sometida a mayores variaciones, debido a la distinta densidad de los tejidos y la posible ruptura de sus estructuras duras durante el transporte. Por esta razón pronto comenzaron a aparecer variaciones de este índice que sustituían en el denominador el volumen total del erizo por su peso fresco.

2. $IG = [\text{Volumen de la gónada (ml)} / \text{Peso fresco total del erizo (g)}] * 100$

Posteriormente, esta evolución hacia el uso de pesos en lugar de volúmenes (más complejos de obtener) continuó y aparecieron los primeros trabajos que solo utilizaban pesos frescos en el cálculo del índice gonadal.

3. $IG = [\text{Peso fresco de la gónada (g)} / \text{Peso fresco total del erizo (g)}] * 100$

El principal problema de las últimas dos expresiones es que en ocasiones incluyen en el cálculo del índice gonadal, el peso del agua que se encuentra dentro del caparazón del erizo, que es muy variable a lo largo del tiempo y entre ejemplares. No obstante, a pesar de esta gran variabilidad, son mayoría los autores que han empleado en el cálculo del índice gonadal los pesos frescos. La razón del empleo mayoritario de los pesos húmedos es que son muy rápidos de obtener y que ofrecen una visión muy realista del rendimiento gonadal, que en última instancia es lo que determina la comerciabilidad de los erizos. Para evitar la variabilidad de los pesos frescos y especialmente la asociada al agua retenida en el interior del caparazón, algunos autores optaron por el empleo de pesos húmedos escurridos, o bien por emplear pesos secos.

El empleo de pesos secos puede ser exclusivo de la gónada o extenderse a todas las partes del erizo. Está última elección o ligeras modificaciones de la misma (ver Lozano

et al 1995) ha sido muy utilizada por los autores que han estudiado la evolución del índice gonadal en poblaciones naturales en los últimos años:

4. **IG = [Peso seco de la gónada de la gónada (g) / Peso fresco total del erizo (g)]*100**

5. **IG = [Peso seco de la gónada de la gónada (g) / Peso seco total del erizo (g)]*100**

I.G. EMPLEADO	AUTORES
1) I.G. =(Volumen gónada/Volumen testa) x 100	Moore (1934)
2) I.G. = (Volumen gónada/Peso húmedo del cuerpo) x 100	Lasker y Giese (1954), Fenaux (1968)
3) I.G. = (Peso húmedo de la gónada/Peso húmedo cuerpo) x 100	Allain (1972), Catoira <i>et al</i> (1988, 1991, 1995), Haya de la Sierra (1990), Miguez y Catoira (1990), Guettaf y San Martín (1995), Fernández y Boudouresque (2000), Gago <i>et al</i> (2001) Sánchez-España (2003), Sphigel <i>et al</i> (2003, 2005), Arafa <i>et al</i> (2006), Barbaglio <i>et al</i> (2007), Harrington <i>et al</i> (2007).
4) IG = (Peso seco de la gónada de la gónada / Peso fresco total del erizo) x 100	Urgorri <i>et al</i> 1994; Sellem y Rezig, 1995
5) I.G. =(Peso seco de la gónada/Peso seco del cuerpo) x 100	Regis (1978), Byrne (1990), Lozano <i>et al</i> (1995), Spirlet <i>et al</i> (1998), Tomas <i>et al</i> (2005); Sellem y Guillou (2007)
6) I.G. =(Peso seco gónada/(Diámetro horizontal testa) ³) x 100	Semroud et Kada (1987), Guettaf (1997, 2000), Fernández y Boudouresque (1997); Bayed <i>et al</i> (2005)

Tabla 3.2.5.1. Tipos diferentes de I.G. encontrados en la bibliografía. Adaptado de Guettaf 1997.

Por último, existen gran variedad de combinaciones entre pesos secos, frescos y volúmenes que han sido empleadas por distintos autores y son varios los trabajos en los que se sustituye el cálculo directo del volumen por el diámetro al cubo del erizo.

Un ejemplo de este tipo de índices es el número 6:

$$6. \text{ IG} = [\text{Peso seco de la gónada de la gónada (mg)} / \text{diámetro}^3 (\text{cm}^3)] * 10$$

En este trabajo se han comparado los índices 3, 5 y 6 que emplean pesos frescos, pesos secos y finalmente el peso seco de la gónada dividido entre el diámetro al cubo. En la obtención del índice 3 se utilizaron los pesos frescos tras eliminar el agua contenida dentro del caparazón y dejar escurrir todas las partes del erizo durante al menos cinco minutos. Los índices fueron obtenidos mediante el estudio de todos los erizos analizados y su evolución a lo largo del periodo de estudio fue comparada. Como se observa en la Figura 3.2.5.1 los tres índices muestran una evolución muy similar, con incrementos y descensos en las mismas épocas.

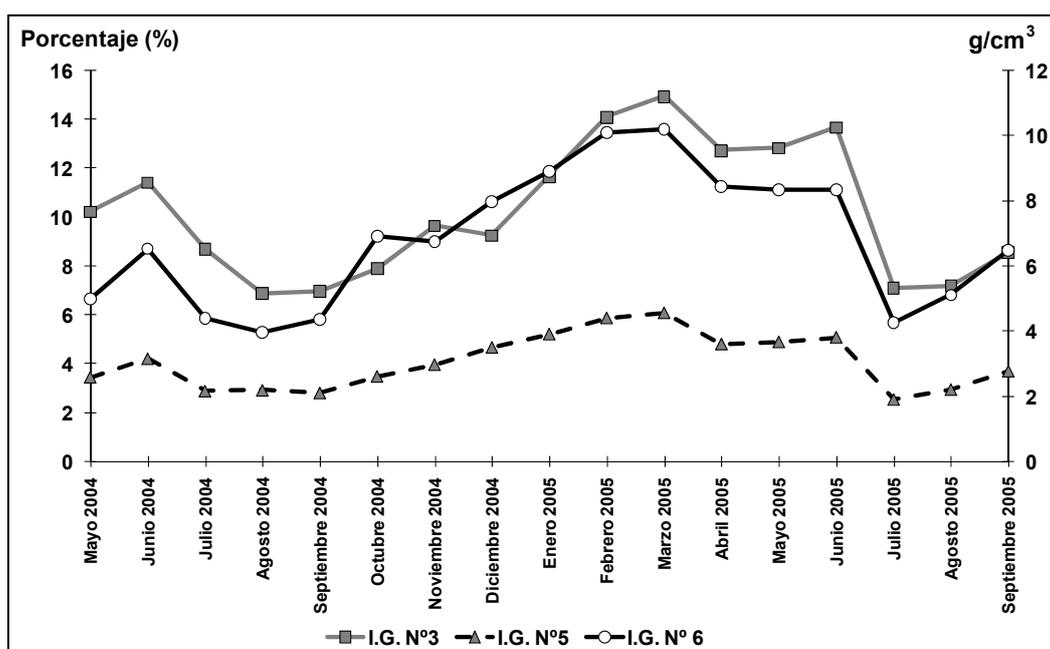


Figura 3.2.5.1. Evolución para el conjunto de poblaciones de los índices gonadales 3, 5 y 6. Obsérvese que la evolución de los tres índices es prácticamente igual. Los índices 3 y 5 se expresan en porcentaje, mientras que el índice número 6 lo hace en mg/cm^3

Además se analizó el grado de correlación entre los tres índices (Tabla 3.2.5.2). Los tres muestran correlaciones elevadas (con un valor de R^2 mayor de 0,8 en todos los casos), si bien el índice que emplea volúmenes en lugar de pesos (I.G. N° 6) muestra un menor valor de correlación con los otros dos índices ($R^2 = 0,801$ y $0,886$) que estos entre sí ($R^2 = 0,904$).

		GI Húmedo	I.G.V	GI Seco
GI Húmedo	Correlación de Pearson	1	,801**	,904**
	Sig. (bilateral)		,000	,000
	N	1277	1262	1277
I.G.V	Correlación de Pearson	,801**	1	,886**
	Sig. (bilateral)	,000		,000
	N	1262	1262	1262
GI Seco	Correlación de Pearson	,904**	,886**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	
	N	1277	1262	1277

Tabla 3.2.5.2. Tabla con los índices de correlación de Pearson para los tres índices analizados.

De los dos índices que emplean pesos secos, se ha escogido el que utiliza los pesos frescos por ser el más empleado en la bibliografía (Tabla 3.2.5.1), lo que permite comparar este trabajo con un mayor número de estudios, así como por ofrecer información directa sobre el precio en el mercado de los erizos analizados, donde es el peso fresco de las gónadas el que marca el valor comercial del erizo.

3.2.5.1. Índice Gonadal Insegado (I.G.I.)

El índice gonadal insegado (Ourens, 2007) es una interesante adaptación del I.G.S., cuya principal ventaja es que no se ve afectado por diámetro del erizo, por lo que permite la comparación entre poblaciones con tallas distintas, como las poblaciones de intermareal y submareal.

El I.G.I. se obtiene del valor del residuo obtenido a partir del modelo de regresión entre el peso seco de las gónadas y el diámetro. La relación entre estas dos variables se calculó mediante un análisis de regresión por estimación curvilínea. Tras analizar todos los modelos se escogió la potencia por ser el que mostraba un mayor R^2 (0,595). Los coeficientes del modelo se presentan en la Tabla 3.2.5.3 mientras que la representación del modelo frente a los valores observados se muestra en la Figura 3.2.5.2.

R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típico de la estimación
,772	,595	,595	,542

Tabla 3.2.5.3. Resumen del modelo de regresión entre el peso seco de las gónadas y el diámetro en el que se muestran los valores de R y R^2 .

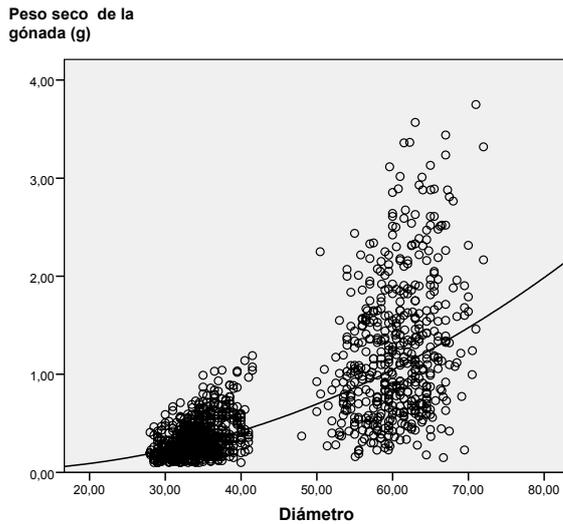


Figura 3.2.5.2. Representación gráfica del modelo de estimación del peso seco de la gónada frente al diámetro (expresado en mm) en relación a los valores observados.

El valor del I.G.I. es el valor del residuo, calculado a partir de la diferencia entre el peso seco predicho por el modelo en función del diámetro del erizo y el peso seco observado.

Al tratarse del resultado de una diferencia de valores y no de un cociente el índice gonadal insesgado se presenta en gramos y no en porcentaje como otros índices gonadales empleados en esta tesis. Este índice elimina cualquier posible influencia del diámetro, manteniendo el efecto del resto de variables, como el estado de desarrollo gonadal, el estado nutricional, etc.

En la Figura 3.2.5.2 se observa como los diámetros más bajos muestran una menor dispersión respecto a los diámetros más grandes. Este índice se empleó en aquellos análisis en los que las características de los datos no permitían el empleo de estadística paramétrica (y por lo tanto no se podía incluir el diámetro como covariable) con el objeto de poder comparar poblaciones con distintos diámetros medios.

La evolución de ambos índices (Húmedo e Insesgado) se analizó para el conjunto de erizos a lo largo del periodo de estudio, tal y como se hizo con los índices gonadales 3,5 y 6.

Ambos índices muestran una evolución similar en el análisis del conjunto de poblaciones, como puede observarse en la Figura 3.2.5.3.

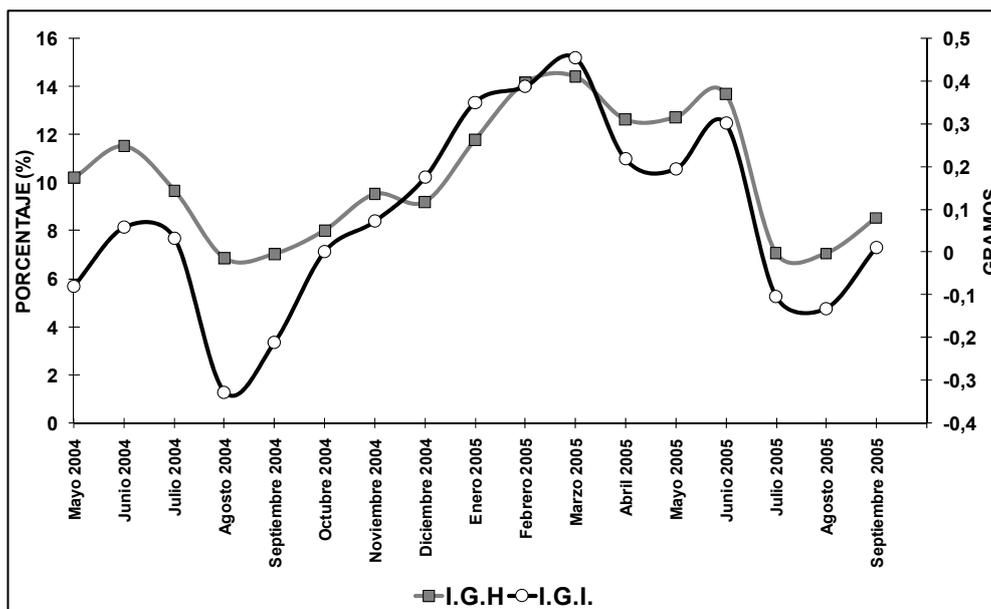


Figura 3.2.5.3. Evolución para el conjunto de poblaciones de los índices gonadales húmedo e insesgado.

3.2.6. CLASIFICACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

La metodología empleada para la realización de los cortes histológicos es muy similar entre los distintos autores. No obstante, la clasificación de las distintas etapas por las que pasa el desarrollo gonadal o la metodología empleada para evaluar este desarrollo varía de manera importante entre ellos.

El primer autor en utilizar los cortes histológicos como complemento del índice gonadal en *P. lividus*, fue Fenaux (1968). Este autor utilizó el porcentaje de hembras maduras para describir el ciclo gonadal en tres especies de erizos mediterráneos, incluyendo *P. lividus*.

Más de veinte años después Byrne (1990) y Haya de la Sierra (1990) retomaron la realización de cortes histológicos en gónadas de *P. lividus*. Byrne (1990) clasificó el desarrollo gonadal en seis fases distintas en función del grado de madurez (Tabla 3.2.6.1). Además, ambos autores realizaron mediciones de los oocitos para establecer el grado de desarrollo de la gónada.

Lozano *et al* (1995) no utilizaron la clasificación en fases de desarrollo. En su lugar, establecieron índices de madurez, midieron el grosor de la capa nutritiva y realizaron

mediciones del diámetro de los oocitos. Todos estos datos ofrecen también una buena imagen del grado de desarrollo gonadal de los erizos estudiados, si bien son más laboriosos de obtener.

Guettaf (1997) estudió el ciclo gonadal de una de sus poblaciones y clasificó el desarrollo gonadal en seis fases muy similares a las descritas por Byrne (1990), además de medir el diámetro de los oocitos.

Posteriormente Spirlet *et al* (1998) clasificaron el ciclo gonadal de *P. lividus* en 8 fases distintas, desarrollando además un índice de madurez (Tabla 3.2.6.1).

Los últimos trabajos que han analizado la evolución del ciclo gonadal de *P. lividus* han optado por la clasificación en fases, bien en cuatro fases (Sánchez-España, 2004; Barbaglio *et al*, 2007) o en seis fases (Sellem y Guillou, 2007).

En este trabajo se ha optado por el empleo de la clasificación en fases de desarrollo como indicador del estado gonadal, por ser más sencillo de obtener en comparación con la medición de oocitos o del diámetro de la capa nutritiva y ofrecer una información muy completa.

La medición del diámetro de los oocitos además de ser muy laboriosa, ofrece información que puede ser engañosa, especialmente en las últimas fases de desarrollo, donde los óvulos relictos de gran tamaño no pueden ser diferenciados de los óvulos de una gónada madura. Además, esta metodología tampoco proporciona información sobre las fases de puesta parcial, que no se observan en un histograma con frecuencias del diámetro de los oocitos.

Entre las distintas metodologías propuestas para describir el ciclo gonadal mediante su clasificación en fases, se ha optado por la empleada por Byrne (1990), más sencilla e interpretable que la utilizada por Spirlet *et al* (1998) y más completa que la empleada por Haya de la Sierra (1990) y Sánchez-España (2004). La Tabla 3.2.6.1 muestra una comparativa de estas metodologías.

Sánchez-España et al 2004	Byrne, 1990	Spirlet et al, 1998
Fase IV: Fase de reconstitución gonadal. Tras la puesta la gónada comienza a recuperarse.	Fase I: Fase de reconstitución Gonadal. La gónada llena los espacios vacíos con tejido de reserva. Gran número de fagocitos.	Fase II: Fase “Spent” II, El ovario se llena de una tupida red de fagocitos
	Fase II: Fase de crecimiento. Se inicia el desarrollo de los oocitos.	Fase III: Fase de reconstitución gonadal
Fase II: Fase de maduración. Los oocitos aumentan de tamaño hasta convertirse en óvulos	Fase III: Fase de premaduración. Hay óvulos de todos los tamaños que crecen desde la pared gonadal.	Fase IV: Fase de crecimiento Se inicia el desarrollo de los oocitos.
	Fase IV: Fase Madura. La gónada se encuentra llena de óvulos maduros	Fase V: Fase Puesta parcial. Aparecen huecos dejados por los óvulos liberados al medio.
Fase III: Estado maduro. La gónada se encuentra llena de óvulos maduros	Fase V: Fase Puesta parcial. Aparecen huecos dejados por los óvulos liberados al medio.	Fase VI: Fase madura La gónada se encuentra llena de óvulos maduros
	Fase VI: Fase Post-puesta. La gónada aparece vacía o con algo de tejido de reserva que comienza a regenerarse.	Fase VII: Fase Puesta parcial Aparecen huecos dejados por los óvulos liberados al medio
Fase I: Fase post-puesta Tras el desove, la gónada se halla casi vacía con tan solo algunos óvulos residuales en su interior.	Fase VI: Fase Post-puesta. La gónada aparece vacía o con algo de tejido de reserva que comienza a regenerarse.	Fase VIII: Fase Post-puesta. Grandes espacios vacíos pero aún varios óvulos.
		Fase I: Fase “Spent” I. Ovario vacío excepto por algunos óvulos relictos

Tabla 3.2.6.1. Desarrollo de las distintas clasificaciones propuestas en la literatura. Las casillas con dos colores corresponden a fases que se extienden entre dos de las etapas descritas por otros autores. Por ejemplo, la fase II de Byrne, abarca parte de las fases IV y II empleadas por Sánchez-España La clasificación empleada en este trabajo es la propuesta por Byrne (1990).

3.2.7. DESCRIPCIÓN DE LAS FASES GONADALES EMPLEADAS

3.2.7.1. Fase I: Fase de reconstitución gonadal

La gónada está completamente recubierta de tejido de reserva (de color rosa) y de una tupida malla de fagocitos que le dan una apariencia vacuolada. En la Figura 3.2.7.1 B y C se pueden ver como pequeños puntos de color lila que salpican el interior del saco gonadal.

Estas células contienen gotas Pas+ altamente eosinófilas, que les dan la tonalidad oscura. El número y tamaño de estas células fagocíticas determinan el incremento de peso de la gónada durante la fase de recuperación gonadal (Harrington *et al*, 2007).

El ovario contiene oocitos primarios de entre 5 y 30 μm de diámetro que se encuentran en la pared tisular. Normalmente se observan como pequeños gránulos de color oscuro insertados en la parte exterior de la masa gonadal.

Al comienzo de la fase I estos oocitos son tan pequeños que prácticamente no son visibles (Figura 3.2.7.1 A), haciéndose más evidentes a media que la gónada madura. El tamaño de estos oocitos es lo que determina cuándo se alcanza la fase II. Por último, en ocasiones pueden encontrarse óvulos residuales en proceso de lisis por las células fagocíticas inmersos en el tejido de reserva.

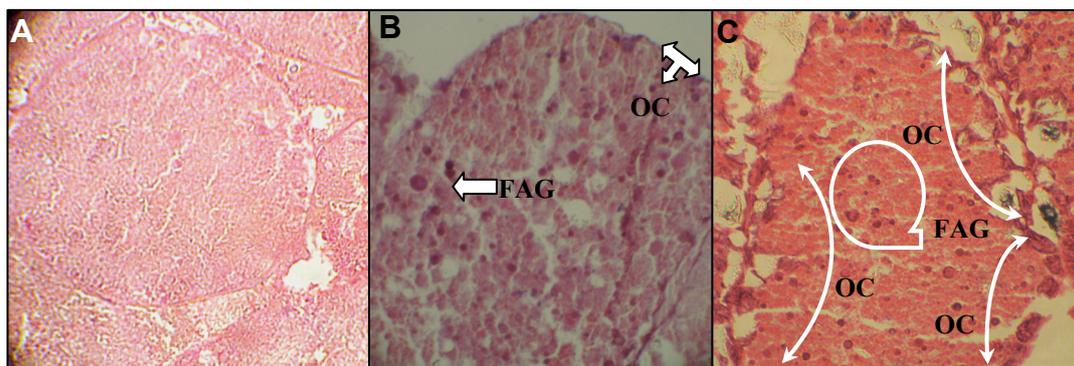


Figura 3.2.7.1. Imágenes de tres estadios diferentes de la fase I: A) fase I en un estado inicial, los huecos dejados por los óvulos liberados han sido completamente rellenados por tejido de reserva pero los oocitos aún no se aprecian en la pared gonadal. B) Detalle de una gónada en fase I en un estado un poco más avanzado que la imagen A. En la pared gonadal se aprecian algunos engrosamientos que corresponden a oocitos (OC) en fases muy tempranas de desarrollo y vacuolas de color lila formadas por las células fagocíticas (FAG). C) Fotografía de una fase I a punto de alcanzar la fase II, como se aprecia por el tamaño de alguno de los oocitos (OC) presentes en la pared gonadal.

3.2.7.2. Fase II: Fase de crecimiento

En esta fase comienza la vitelogénesis de los oocitos, incrementándose la talla de estas células hasta los 50 μm . Estos oocitos continúan unidos a la pared gonadal, alargándose hacia el interior (Figura 3.2.7.2 B).

Los fagocitos siguen siendo numerosos (Figura 3.2.7.2 A) pero su frecuencia comienza a disminuir hasta desaparecer por completo en la fase IV. El tejido de reserva comienza a desaparecer aunque aún se mantiene muy denso.

La capa nutritiva se encuentra más desarrollada y tiene un mayor grosor. Todavía es posible, aunque menos frecuente encontrar algún óvulo residual.

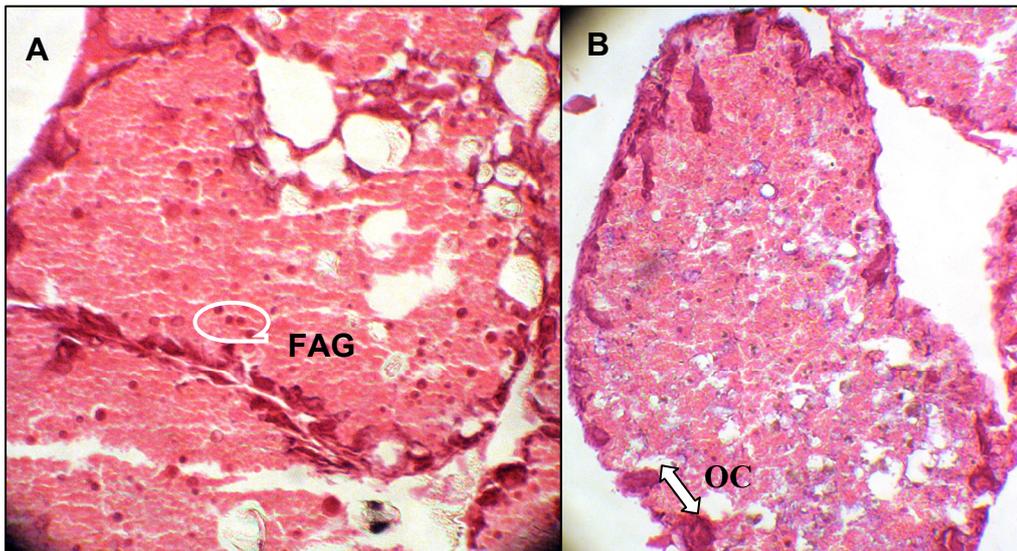


Figura 3.2.7.2. Los oocitos (OC) comienzan a engrosar desde la pared tisular aumentando de tamaño, tal y como se observa en la Figura B. Los fagocitos son aún numerosos (Figura A) pero comienzan a disminuir su número, llegando a desaparecer en la fase IV.

3.2.7.3. Fase III: Fase de premaduración

La vitelogénesis continúa aumentando la talla de los oocitos. En la pared gonadal se pueden encontrar oocitos de todos los tamaños, desde los 10 hasta los 90 μm .

El tejido de reserva comienza a desaparecer y las células fagocíticas son cada vez más escasas. Es posible observar algún óvulo maduro en el centro junto con grandes

ovocitos que comienzan a acumularse y madurar, como se aprecia en la Figuras 3.2.7.3 B. Esta fase es la primera en la que aparecen óvulos maduros y en algunos casos es directamente desde esta fase cuando se alcanza la fase V o fase de puesta parcial al realizar una puesta directamente desde esta parte del desarrollo gonadal, liberando los óvulos maduros en lugar de almacenarlos en el centro del saco gonadal.

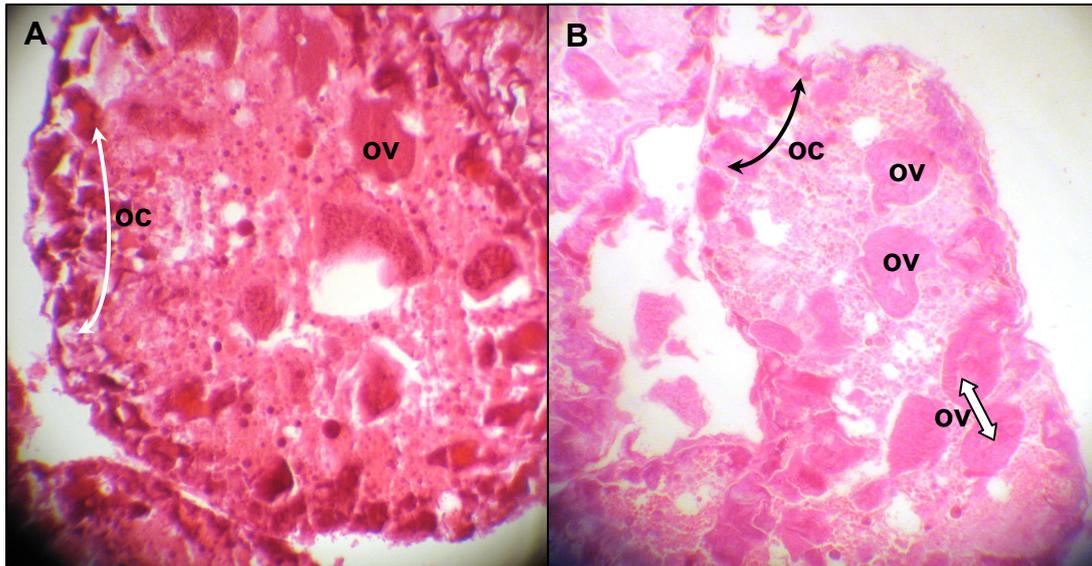


Figura 3.2.7.3. En esta fase gonadal aparecen los primeros óvulos maduros (OV) que migran hacia el centro del saco gonadal para comenzar a ser almacenados (Figura B). Mientras, en la pared gonadal los oocitos continúan con la vitelogenesis, por lo que es posible encontrar oocitos de todos los tamaños (Figuras A y B). El tejido de reserva se hace más laxo y desaparece en algunas zonas (Figura B).

3.2.7.4. Fase IV: Fase madura

Al final del estado III los ovocitos alcanzan su talla máxima (70-100 μm) y maduran convirtiéndose en óvulos listos para su liberación al medio. En la fase IV, el ovario se muestra repleto de estos óvulos maduros que ocupan todo el espacio, el tejido nutritivo y los fagocitos desaparecen prácticamente del todo (Figura 3.2.7.4).

Aunque aún es posible encontrar ovocitos inmaduros desarrollándose en la pared gonadal, estos son muy escasos y la pared gonadal es muy fina (Figura 3.2.7.4 B).

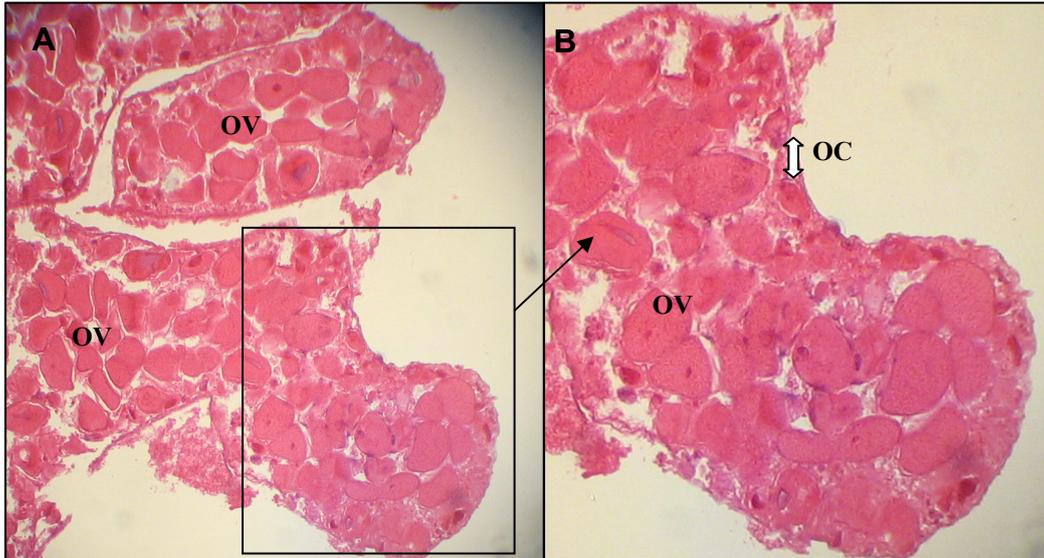


Figura 3.2.7.4. Gónada en Fase IV, con los sacos gonadales repletos de óvulos maduros. (OV). La figura B es una imagen en detalle de la zona encuadrada en la figura A en la que se aprecian en detalle la presencia de los óvulos maduros densamente almacenados, así como algunos oocitos aún inmaduros en la pared gonadal.

3.2.7.5. Fase V: Fase de puesta parcial

Tras la fase III o tras la fase IV el erizo comienza la puesta. Cuando se observa una gónada en puesta pero aún con numerosos gametos maduros, esta gónada se encuentra en fase V o fase de puesta parcial. Se caracteriza por la presencia de óvulos maduros con numerosos espacios vacíos entre ellos (dejados por los óvulos ya liberados) y por la ausencia de tejido de reserva, que dan a la gónada un aspecto hueco.

Esta fase es diferente a las fases anteriores en el sentido de que es posible llegar a ella de dos maneras: la gónada puede completar el ciclo entero pasando por todas las fases y llegar a la fase V a través de la fase IV, o bien puede comenzar la puesta soltando los óvulos maduros a medida que se van formando, alcanzando la fase V directamente desde la fase III.

No siempre es sencillo distinguir cuál ha sido el camino seguido por la gónada y por ello no se ha distinguido entre dos sub-fases a la hora de hacer la clasificación de las gónadas. No obstante, en muchas ocasiones este camino puede intuirse por el aspecto de la gónada.

Cuando el ciclo se ha completado y se ha llegado a la fase V a través de la IV, la gónada no presenta tejido de reserva y la pared gonadal es mucho más fina con una menor presencia de oocitos desarrollándose (Figura 3.2.7.5).

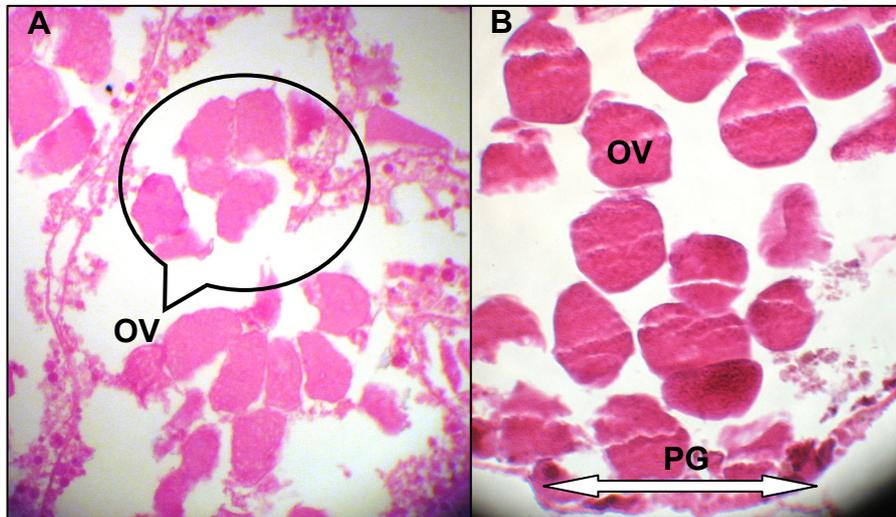


Figura 3.2.7.5. Gónadas en fase V (desde fase IV). Obsérvese la ausencia de tejido de reserva y la gran cantidad de espacio entre los óvulos que da a la gónada un aspecto hueco, característico de la Fase V. A) Visión general de varios sacos gonadales en fase V (desde fase IV). Obsérvese la ausencia de oocitos. B) Detalle de un saco gonadal en fase V, en el que se aprecia lo fina que aparece la pared gonadal (PG) en los erizos que han realizado la fase V tras alcanzar la fase IV.

En el caso contrario, es posible encontrar aún tejido de reserva y la pared gonadal es gruesa con abundantes oocitos de todos los tamaños. En este tipo de fase V, se mantiene la vitelogénesis al mismo tiempo que se produce la puesta, sustituyendo los óvulos liberados por otros nuevos (Figura 3.2.7.6).

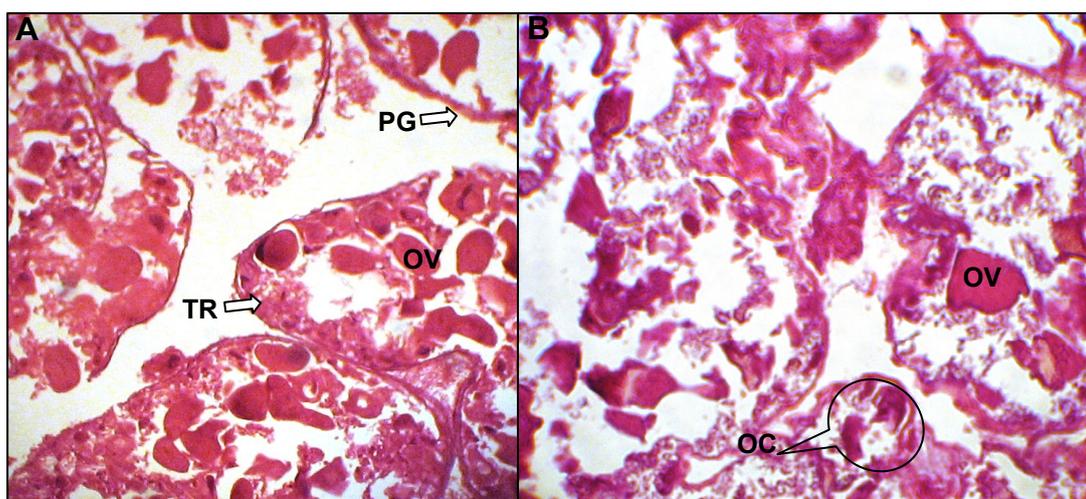
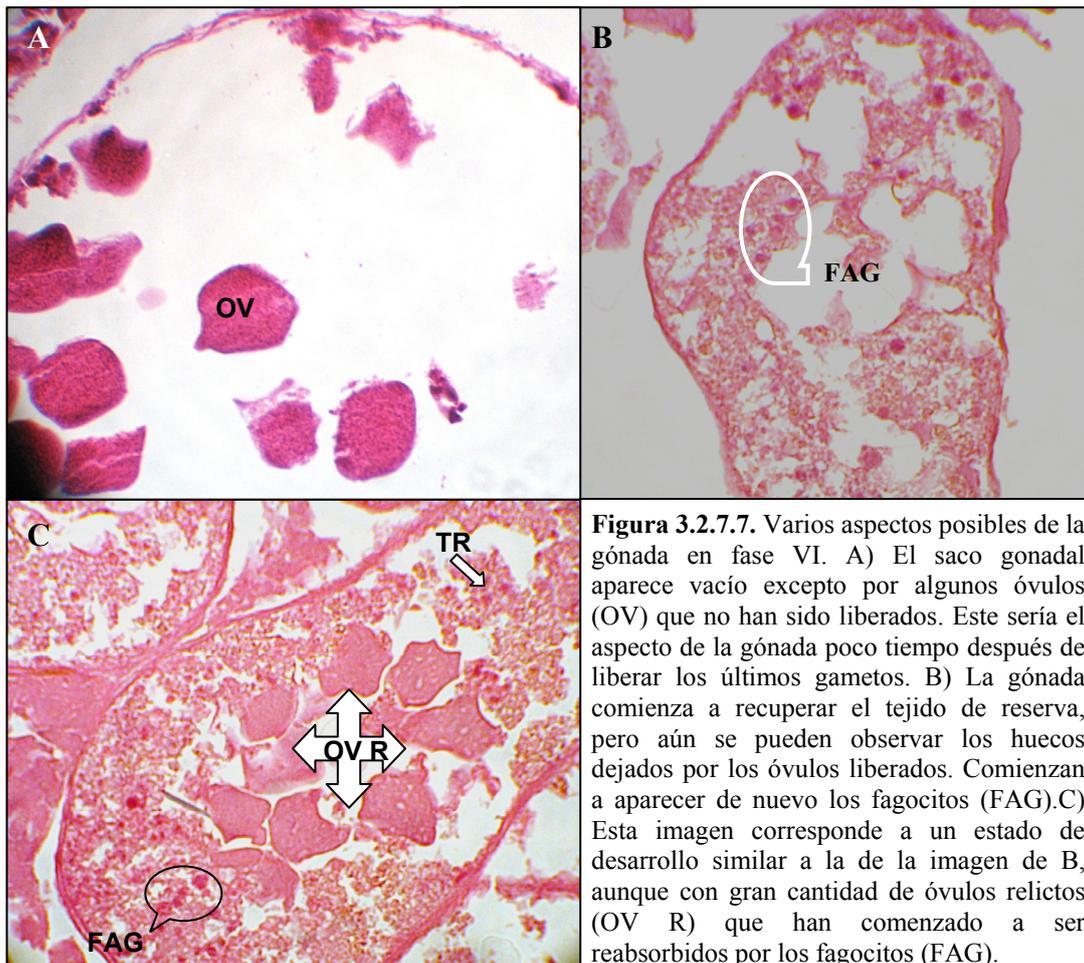


Figura 3.2.7.6. Imagen de dos gónadas en fase V, desde fase III. A) Obsérvese la presencia de tejido de reserva (TR), que aún no ha sido consumido del todo y el grosor de la pared gonadal, superior al de las gónadas que alcanzaron la fase V desde fase IV B) En esta imagen, se observan aún numerosos oocitos desarrollándose desde la pared gonadal que remplazarán los huecos dejados por los óvulos liberados.

3.2.7.6. Fase VI: Fase Post-puesta

El ovario aparece prácticamente vacío (Figura 3.2.7.7) excepto por algunos óvulos residuales que no han sido liberados y que serán reabsorbidos por los fagocitos.

El tejido de reserva comienza a aparecer al final de esta fase y puede llegar a ocupar zonas importantes del saco gonadal. La pared gonadal se encuentra muy delgada. La fase VI da paso a la fase I con la aparición de los primeros oocitos en la pared gonadal.



3.2.8. OBTENCIÓN DE DATOS DE TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA

3.2.8.1. Datos de temperatura

En la obtención de los datos de temperatura se utilizaron dos fuentes de información: datos de temperatura medidos *in situ* y datos oceanográficos obtenidos de la red de medida costera de Puertos del Estado.

El objetivo de las mediciones de temperatura *in situ* era doble:

- Conocer directamente las variaciones mensuales de temperatura en las zonas de estudio y compararlas con los datos obtenidos en las boyas oceanográficas.
- Medir la temperatura en función del hábitat, registrando las variaciones de temperatura en los charcos de marea.

Las mediciones de temperatura *in situ* se realizaron durante la bajamar y siempre que fue posible por la mañana, aunque en ocasiones, por requerimientos del nivel de la marea, fue necesario realizarlos por la tarde. En la medición de las temperaturas se empleó un termómetro digital (Luft C-100), con una precisión de centésima de grado (Figura 3.2.8.1).



Figura 3.2.8.1. Termómetro digital empleado en la medición de las temperaturas *in situ*.

La variabilidad de las medidas de temperatura es muy elevada, especialmente en los charcos de marea. En este hábitat se midió la temperatura de tres charcos de marea y se realizó la media, con el objeto de registrar la variabilidad existente dentro de los propios charcos. En el hábitat submareal las mediciones se realizaban en el volumen de agua extraído para la determinación de la concentración de clorofila (inmediatamente después de recoger el agua).

Las mediciones *in situ* de temperatura fueron mensuales y puntuales y por lo tanto estaban sometidos a una gran variabilidad. Por esta razón, los datos obtenidos en las calas muestreadas se complementaron con medidas obtenidas de Puertos del Estado.

Concretamente se obtuvieron datos de temperatura superficial de las boyas de Bilbao (43°29'9''N; 3°7'9''O) y Gijón (43°36'90''N; 5° 39'87''O) pertenecientes a la red costera de medida de esta institución. Se trata de boyas oceanográficas modelo TRIAXYS (Figura 3.2.8.2) que emiten los datos por radio a una estación en tierra donde se almacenan en tiempo real.

La estación de Islares se encuentra muy cerca de la boya oceanográfica de Bilbao (a menos de 10 millas de distancia), que además es la boya oceanográfica más cercana a todas las estaciones (unas 35 millas hasta Arnía y unas 50 hasta Fonfría), mientras que la boya de Gijón se encuentra más alejada de las estaciones de muestreo (más de 70 millas de la estación más cercana que es Fonfría).

Las temperaturas oceanográficas están sometidas en la costa norte española a un gradiente longitudinal, siendo las aguas de la zona Este más calientes en invierno y más frías en invierno (Diez *et al*, 2000). Debido a esto resulta interesante contar con los datos de temperatura de las boyas de ambos extremos (occidental y oriental) para conocer los rangos de temperatura entre los que se situaran las temperaturas en las estaciones de muestreo.

Las boyas proporcionan datos de temperatura cada hora, todos los días del año. No obstante, muchos días no incluían datos válidos para todas las horas e incluso en ocasiones había periodos de varios días con pocas o ninguna medición. Se dispone de datos para ambas boyas desde marzo de 2004.



Figura 3.2.8.2 (Obtenida de la página Web de puertos del estado, www.puertos.es). **Boya TRIAXYS:** Boya de forma esférica de 91cm de diámetro. Dispone de un sensor de temperatura del agua, acelerómetros de estado sólido, un giróscopo piezoeléctrico y un compás controlado por microprocesador. La señal se transmite vía radio a un receptor digital en tierra.

La boya de Gijón registró una media de 566 mediciones mensuales entre marzo de 2004 y octubre de 2005, lo que da una media de unas 19 mediciones diarias. La boya de Bilbao por su parte registró una media de 626 mediciones mensuales, es decir unas 21 mediciones diarias.

Los datos brutos fueron tratados con el programa informático SPSS y se obtuvieron los valores medios de temperatura para los últimos 15 días de cada mes (para compararlos mejor con los datos de temperatura puntuales obtenidos a finales de mes). En el mes de enero de 2005 no hubo ningún valor de temperatura registrado para los últimos 15 días del mes, por lo que se utilizaron datos de los primeros cinco días del mes de febrero.

3.2.8.2. Determinación de la Concentración de Clorofila

Con el objeto de tratar de analizar la variación en las poblaciones fitoplanctónicas se analizó de manera mensual la concentración de clorofila, tanto en las poblaciones submareales como en los charcos de marea mediante el método de extracción con acetona (SCOR-UNESCO, 1966). Para ello, durante los muestreos se recogían muestras de agua en botellas de plástico opaco de cinco litros. La recogida de la muestra de agua, se hacía una vez finalizada la recogida de erizos, para reducir al mínimo el tiempo transcurrido desde que la muestra era extraída, hasta que esta se filtraba en el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, la muestra de agua se filtraba con ayuda de una bomba de vacío (*SELECTA Vacuum Press*, Figura 3.2.8.3 A) a una presión aproximada de 0,8-0,9 atm. El agua se hacía circular por un filtro (*WHATMAN GF/C*, Figura 3.2.8.3 B) con un poro de 1,2 μm de diámetro. Una vez toda la muestra de agua había sido filtrada o bien

una vez el filtro había sido completamente colmatado, este se extraía y se introducía en un recipiente con un volumen conocido de acetona al 90%. El recipiente con el filtro completamente sumergido en la acetona se mantenía durante 48 horas, refrigerado a una temperatura de 3°C. Pasado este tiempo, el filtro se homogeneizaba en la misma acetona en la que había sido mantenido y después se centrifugaba a unas 2000 r.p.m. durante 10 minutos.

La fracción sobrenadante se extraía y se medía para conocer el volumen exacto. Después, parte de este sobrenadante era introducido en un espectrofotómetro (*HACH DR-2500*, Figura 3.2.8.4) y se medían las absorbancias en las siguientes longitudes de onda: 665 y 750 nm. Una vez obtenidos los distintos valores de absorbancia, la concentración de clorofila se calculaba como:

$$[\text{Clorofila } \mu\text{g/l}] = (12,6 \times (\text{Abs}_{665} - (\text{Abs}_{750} - 0,002))) \times (V/B)$$

Donde:

Abs_{665} = Absorbancia a 665 nm

V = Volumen de sobrenadante (ml)

Abs_{750} = Absorbancia a 750 nm

B = Volumen de agua filtrado (ml)

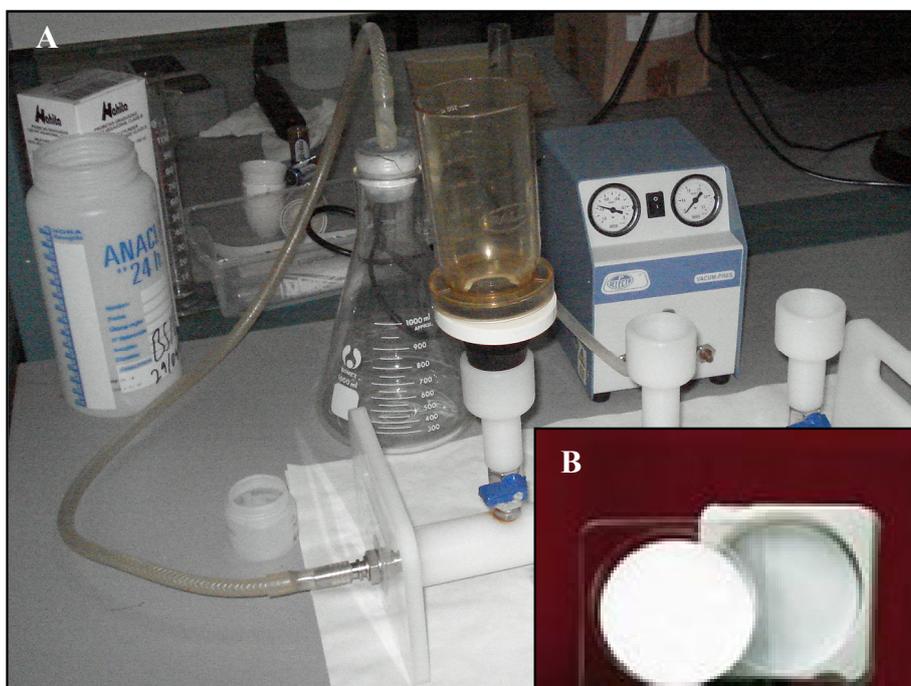


Figura 3.2.8.3. A) Bomba de vacío *SELECTA Vacum Press* utilizada en el filtrado de las muestras de aguas extraídas para la determinación de Clorofila. **B)** El agua se hacía circular por el filtro *WHATMAN GF/C* que se observa en la parte inferior derecha de la figura.

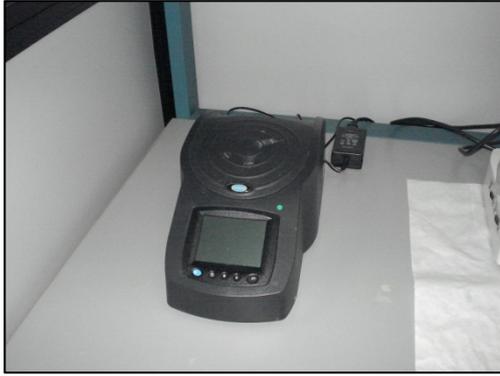


Figura 3.2.8.4. Espectrofotómetro *HACH DR-2500* utilizado en las lecturas de las absorbancia para la determinación de la concentración de clorofila.

3.2.9. TRATAMIENTO DE DATOS

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio del ciclo gonadal se ha realizado con la ayuda del paquete estadístico SPSS. Se ha considerado que una prueba era significativa cuando el p-valor era menor de 0,05 y muy significativa para valores menores de 0,01. En este capítulo se han realizado principalmente comparaciones de medias y regresiones (lineales o por estimación curvilínea) y se ha empleado tanto estadística paramétrica como no paramétrica.

El primer paso en el análisis de los datos era la comprobación del ajuste a la distribución normal. Para ello se empleó la prueba de Kolgorov-Smirnof en cada una de las sub-muestras analizadas. El ajuste de los datos a esta distribución se aceptaba para $p > 0,05$.

Cuando la distribución no era normal, se realizaba una transformación de la variable dependiente, normalmente la obtención de la raíz cuadrada, aunque también se probaban otras como la logarítmica. Si aún así la variable dependiente seguía sin mostrar una distribución normal se empleaba estadística para datos no paramétricos.

Cuando la variable dependiente analizada no se ajustaba a la distribución normal se empleaba la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos.

En el caso de las variables cuya distribución se ajustaba a la normal, podían seguirse dos vías, en función del número de factores de la variable analizada:

1. **Factores con dos fuentes de variación:** Se realizaba la prueba T de comparación de medias.
2. **Factores con más de dos fuentes de variación:** Se analizaba la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Si existía homocedasticidad ($p > 0,05$) se realizaba un test ANOVA de comparación de medias. Si esta no estaba clara ($p < 0,05$), volvía a repetirse el test tras realizar transformaciones aritméticas. Si aún así, la premisa de homocedasticidad seguía sin cumplirse se realizaba el test de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos.

Para la realización de comparaciones por parejas, se utilizó la prueba DHS de Tukey cuando existía homogeneidad de las varianzas y la prueba T3 de Dunnet en caso contrario.

En el caso de las comparaciones entre poblaciones de distinto hábitat, la distinta talla muestreada obligaba a realizar análisis que tuviesen en cuenta el posible efecto del diámetro sobre el I.G.H.

No obstante, los análisis multivariante (que permiten introducir el diámetro como covariable y separar su efecto del de otros factores) se pudieron realizar en pocas ocasiones debido a la heterocedasticidad de la variable dependiente, lo que obligó a utilizar el índice gonadal insesgado (I.G.I.) en algunos de estos análisis.

Como ya se ha explicado en el punto 3.2.6 el I.G.I. es un índice gonadal que no se ve afectado por el diámetro, por lo que su utilización permite comparar grupos con distintos diámetros medios.