

AVANCES EN LA TECNOLOGIA DE PRODUCCION DE SEMILLAS DE NAVAJA (*Ensis macha*) EN HATCHERY.

Introducción.

Ensis macha (Molina, 1782) es un bivalvo enterrador, conocido comúnmente como “navaja de mar”, “huepo” o “machuelo”. Esta especie se distribuye desde Caldera (27°3′S; 70°52′O) hasta la región Magallánica (56°30′S; 70°54′O), y en el Océano Atlántico hasta la zona del Golfo de San Matías, al Norte de la Patagonia Argentina (Hernández *et al.*, 2011). Habita fondos blandos de playas arenosas del centro y sur de Chile, a profundidades que pueden alcanzar los 50 m., generalmente formando agregaciones desde los 4 a 10 m de profundidad. Presenta un ciclo reproductivo típico de los bivalvos, con épocas de desove en los meses de verano y periodicidad anual. Es una especie gonocórica, sin dimorfismo sexual (Avellanal *et al.*, 2002). Se caracteriza por presentar concha alargada y valvas semejantes. Ambas valvas se diferencian ya que la valva izquierda posee dos dientes cardinales y dos laterales, y en la valva derecha un diente cardinal y uno lateral, con ligamento externo.

Este bivalvo enterrador constituye un importante recurso para la pesca artesanal de la zona sur de Chile, especialmente en las regiones del Biobío, Los Ríos, Los Lagos y Magallanes, con registros de desembarques de 2.421 ton durante el 2016 (SERNAPESCA 2016¹). Sin embargo, debido a la alta demanda por parte de la industria procesadora, los bancos naturales han sido explotados en forma importante.

En el Golfo de Arauco se desarrolla un gran número de pesquerías artesanales con alto impacto social y económico local (Melo *et al.*, 2005), siendo la pesquería de la navaja, *Ensis macha* Molina, 1782 (Mollusca: Pelecypoda: Solenidae) y navajuela *Tagelus dombeii* Lamarck, 1818 (Mollusca: Verenoida: Solecurtidae), la principal actividad extractiva de moluscos. Esta pesquería representa el 78% de los desembarques nacionales de ambas especies y por otro lado, en la Región de Coquimbo, la navaja prácticamente ha desaparecido, registrándose el último desembarque de pesca artesanal el año 2006, con 18 toneladas (Sernapesca 2016).

Hasta la fecha se han desarrollados proyectos I+D que tienen como objetivo estandarizar la tecnología de cultivo de la navaja, (*i.e.*, Proyecto FONDEF D10I1055y D07I1125), que se han enfocado, principalmente, a la producción masiva de semillas de navaja para el posterior cultivo en áreas de manejo (AMERB) y también hay investigaciones que se enfocan en optimizar la fase reproductiva que mejoran los procesos de maduración y liberación de gametos (Arriagada *et al.*, 2013; Díaz 2015; Estrada *et al.*, 2015 Cubillos y Reyes 2017). Los resultados de estos trabajos complementan los obtenidos hasta el 2011, los que serán mejorados y validados, ya que a inicios del 2017 fue aprobado un proyecto Fondef (IT16I10005), ejecutado por Fundación Chile el cual tiene por objetivo validar y optimizar la tecnología de producción de semilla, alcanzada en el proyecto anterior. Los avances alcanzados se describen a continuación.

Fundación Chile-AquaPacífico

La producción masiva y controlada de semillas de navaja ha sido el principal nudo tecnológico para el desarrollo del cultivo comercial de esta especie. Si bien, los grupos de trabajo de las distintas instituciones que han participado de este desarrollo, establecieron las bases para el desarrollo de tecnológico, no se logró el escalamiento necesario para la producción masiva que promoviera el desarrollo de su cultivo a nivel piloto.

La experiencia productiva y líneas de investigación (I+D+i) de Fundación Chile en moluscos filtradores de importancia comercial, ha permitido avanzar en la optimización del cultivo de la navaja, obteniendo mejoras significativas en las tasas de supervivencia y el porcentaje de asentamiento larval, desarrollando así una estrategia productiva preliminar de cultivo y la obtención de semillas 10-15 mm en sistemas controlados.

Actualmente, Fundación Chile se ha planteado nuevos desafíos con el objetivo de lograr el escalamiento en la producción de semillas de esta especie. El proyecto que actualmente está desarrollando (IT16110005) se concentra en la estandarización y optimización de los protocolos de cultivo para la producción de semillas de navaja.



Semillas de navaja. Foto Fundación Chile

Producción de semillas de navaja en sistema controlado

Reproductores maduros

Hay dos alternativas para disponer de reproductores en estado de madurez avanzada; 1) acondicionamiento en sistemas controlados y 2) extracción desde bancos naturales en época reproductiva. Los esfuerzos por acondicionar reproductores no han sido exitosos, por lo que se ha optado por extraer reproductores desde bancos naturales en períodos reproductivos. Reyes et al., (1994), en su estudio realizado sobre poblaciones de navaja de la Región de los Lagos, establecen que el desove se produce entre los meses de septiembre y noviembre, pudiendo también comenzar en agosto y en noviembre. Por su parte, Lépez et al., (1997) y Aracena et al., (1998), establecen que el desove del recurso Navaja en la Región del BioBío, ocurre entre noviembre y diciembre, coincidiendo con lo registrado por Avellanal *et al.*, 2002.

Inducción al desove

Los estudios de Díaz 2015; Cubillos y Reyes (2017) han registrado la biología reproductiva de la navaja y sus resultados mencionan que los esteroides progesterona, 17β -estradiol y testosterona, presentan una variación estacional los que pueden señalar ventanas del desarrollo gametogénico. Estas variaciones hormonales permiten definir temporalidades endocrinas – fisiológicas, como es el caso del estradiol, hormona que regula el proceso de vitelogénesis y crecimiento ovocitario. Así, la ventana vitelogénica comenzaría cuando el Índice Gonadosomático (IGS) es menor (meses de verano). Por otro lado, la variación de progesterona presenta un patrón similar al estradiol, pero es inverso a lo esperado en otros modelos animales, por lo que se concluye que esta hormona cumpliría funciones desconocidas para la navaja. Respecto a la variación de testosterona, ésta va aumentando en relación directa al aumento de IGS, sugiriendo que esta hormona estaría asociada a la fase final del desarrollo gametogénico. Conocimiento del perfil hormonal, permite caracterizar el ciclo reproductivo y definir la correcta aplicación de inductores a desove.

Para la liberación masiva y sincronizada de gametos y su posterior fecundación, se han realizado diversos estudios, en los cuales, reproductores maduros son agrupados y posteriormente son inyectados con hormonas o inmersos en químicos como inductores al desove. En este contexto Arriagada *et al.*, 2013 y Estrada *et al.*, 2015, realizaron estudios inyectando 0,9 mL de una solución de serotonina (5-HT) 10^{-5} M en la base del pie a reproductores de navaja que habían sido acondicionados en la fase final de la maduración (30 días). La respuesta a esta inducción fue positiva obteniéndose un desove del 62,5% de los reproductores inyectados. Los reproductores machos fueron los primeros en liberar sus gametos, luego de aproximadamente 30 minutos post-inyección con serotonina, mientras que la respuesta de las hembras ocurre luego de aproximadamente 150 minutos post-inyección con serotonina. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Díaz 2015 y Cubillos y Reyes, 2017, ya que con esta misma hormona ellos obtuvieron respuestas positivas poco significativas dentro de las 8 y 12 h post inducción, además no hubo respuesta al inducir con progesterona, estradiol y testosterona. Sin embargo, estos autores registraron mejores respuestas, a través de la inmersión de

reproductores en solución de peróxido (15 mL H₂O₂* 2000 L⁻¹ agua de mar), promoviendo una respuesta positiva y masiva a la liberación de gametos después de 18 h de inducidos.

Desarrollo embrionario

Para efectos prácticos, esta etapa se considera desde la fecundación (presencia de membrana de fecundación), hasta la formación de larva veliger de charnela recta (larva D) en un período de tiempo de 48 h a una temperatura de 17°C y 6-7 mg OD*L⁻¹ (Figura 1). Los ovocitos tienen un diámetro promedio de 88,03 (±4,79) µm, los que son incubados a densidades entre 10 a 30 huevos*mL⁻¹, valores de densidad que no afectan significativamente el crecimiento y supervivencia de los individuos hasta el estado de larva D, las que alcanzan una talla y supervivencia promedio de 118,29 µm y 83%, respectivamente.



Figura 1. Desarrollo embrionario de navaja (*Ensis macha*) en sistema controlado a 17°C, indicando tiempo en horas post fecundación y talla promedio de mayor longitud observada. Fotos: Fundación Chile.

Cultivo larval

Una vez alcanzada la etapa de larva veliger de charnela recta, técnicamente comienza el cultivo larval, que se puede desarrollar en estanques de 7 m³, con agua de mar microfiltrada a 1µm, irradiada con UV y temperada a 18 °C con aireación leve. El protocolo de cultivo de la navaja utilizado es el descrito por López *et al.*, 2011. Sin embargo, algunas modificaciones aplicadas al cultivo, tales como temperatura, dosificación de la dieta y densidad (Estrada *et al.*, 2015), permiten reducir el tiempo de cultivo larval a 13 días, cuando larvas premetamórficas alcanzan una talla promedio de 292,2 (±13,5) µm de longitud valvar (Figura 2).



Figura 2. Desarrollo larval de navaja (*Ensis macha*) en sistema controlado a 18°C, indicando tiempo en días, post fecundación y talla promedio de mayor longitud valvar observada. Fotos: Fundación Chile.

Larvas cultivadas a una temperatura aproximada de 18°C, tienen una tasa de crecimiento que varía entre 15,25 y 15,54 $\mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$, a una densidad de 9 larvas $\cdot \text{mL}^{-1}$, tasa de crecimiento que no difiere significativamente si la dieta protocolar es disminuida al 70% (Figura 3). Sin embargo, la dieta es significativamente influyente, cuando se evalúa la supervivencia, ya que ésta se maximiza cuando se cultiva a una dieta 100% del protocolo de López *et al.*, 2011, alcanzando supervivencias entre 10 – 30%.

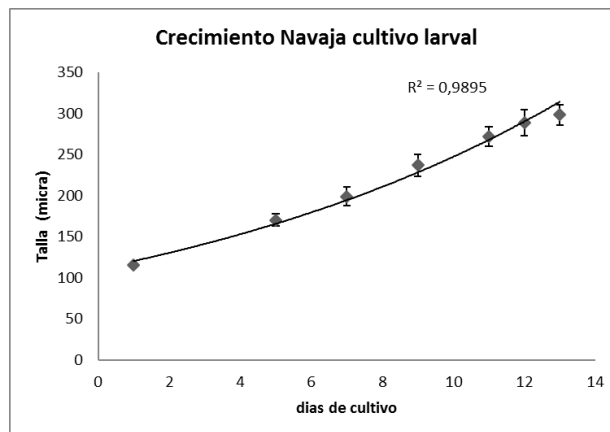


Figura 2. Curva de crecimiento en etapa larval de navaja en ambiente controlado a 18°C. Datos Fundación Chile.

Asentamiento y metamorfosis

El punto más crítico en un cultivo de moluscos es la etapa de metamorfosis y posterior asentamiento. Para la inducción de asentamiento en la navaja se usa el protocolo desarrollado por López *et al.*, 2011.

Larvas competentes son cultivadas en sistemas de anillo con agua de mar filtrada e irradiada con UV durante la etapa de metamorfosis y asentamiento, por un período aproximado de 5 días, hasta que los individuos alcancen el estado de post-larvas. Durante este periodo la circulación de agua de mar es abierto, formando un flujo descendente de agua (down-welling) en cada uno de los sistemas. Durante la fase de asentamiento, cobra importancia la presencia del sustrato, ya que larvas cultivadas a una densidad de 600 larvas $\cdot \text{cm}^{-2}$ con presencia de sustrato, alcanzan las mayores tallas, con valores promedio de 399,8 y 400,02 μm de longitud valvar, con una tasa promedio de crecimiento de 19,95 $\mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$ (Figura 4A). Por otro lado, la supervivencia durante esta etapa es significativamente menor en los tratamientos sin sustrato (SS), con valores que no superan el 7,14% de las larvas inducidas, mientras que los tratamientos con arena (CS) alcanzaron su mayor supervivencia cuando las densidades son más bajas (200 larvas $\cdot \text{cm}^{-2}$) con valores que promediaron 32,9% de las larvas inducidas (Figura 4B).

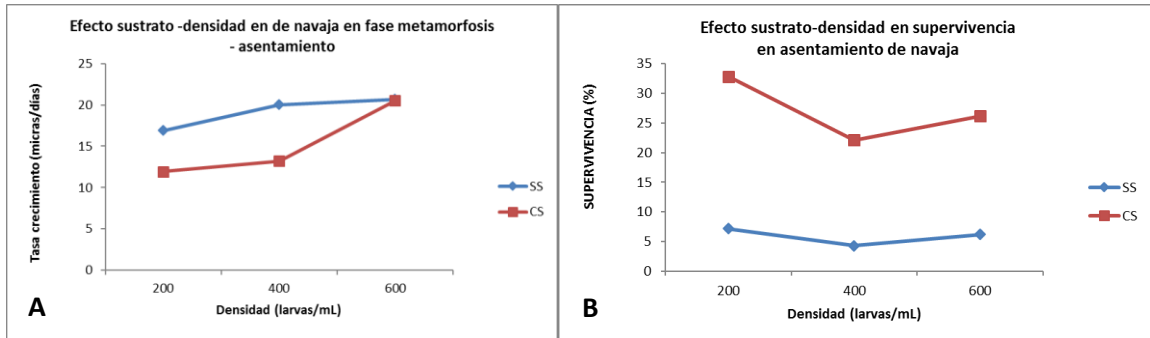


Figura 4. Respuesta de asentamiento de larvas competentes de navaja (*Ensis macha*) a diferentes densidades y presencia (CS) y ausencia (SS) de sustrato. A: Tasa de crecimiento y B: Supervivencia. Datos Fundación Chile.

Cultivo post larval

Larvas post metamórficas, obtenidas de la etapa anterior son mantenidas en los mismos sistemas de asentamiento con flujo descendente de agua, manteniendo una capa de arena tres veces mayor a la longitud de los individuos, hasta que los individuos lleguen a una longitud valvar promedio de 1 mm, la que se alcanza a los 14 – 16 días de cultivo desde iniciado la inducción al asentamiento. El manejo de los juveniles y del sustrato, como la producción de alimento y dieta ofrecida se realiza según protocolo desarrollado por López *et al.*, 2011.

Para la etapa de cultivo post larval en navajas de 1 a 10 mm de longitud valvar, se han probado diversos sistemas de cultivo y manejo a nivel experimental, cuyos resultados aún deben ser validados (Estrada *et al.*, 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos permiten aportar significativamente con información para el desarrollo de una tecnología de producción masiva. Dentro de los sistemas probados, se consideran pruebas de sustrato, densidad y sistema de flujo (up-welling, down-welling y laminar), con los siguientes resultados (Figura 5):

Etapa 1, post larvas hasta 2 mm: sistema con flujo descendente de agua de mar y presencia de sustrato. Tiempo cultivo post larval es de 24 a 26 días con una Tasa de crecimiento de 62,3 a 64,8 $\mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$ y una supervivencia de 15,7%.

Etapa 2, post larvas de 2 mm a pre-semillas de 5 mm: sistema con flujo ascendente de agua de mar y presencia de sustrato. Tiempo cultivo post larval es de 15 días con una Tasa de crecimiento de 192,6 $\mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$.

Etapa 3, pre semilla de 5 mm a semillas de 10 mm: sistema con flujo laminar de agua de mar y presencia de sustrato. Tiempo cultivo pre-semillas es de 14 días con una Tasa de crecimiento de 400,9 $\mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$ y una supervivencia de 10,3%, considerada desde los 2mm de longitud.

En resumen, el cultivo de post larvas de navaja, alcanzan una talla promedio de $10,3 \pm 1,4$ mm a los 55 días de inducido el asentamiento, proceso que ocurre en diversos sistemas de cultivo

post larval, para obtener una tasa de crecimiento de $173,86 \mu\text{m} \cdot \text{día}^{-1}$ y una supervivencia de 1,6% (Figura 6).

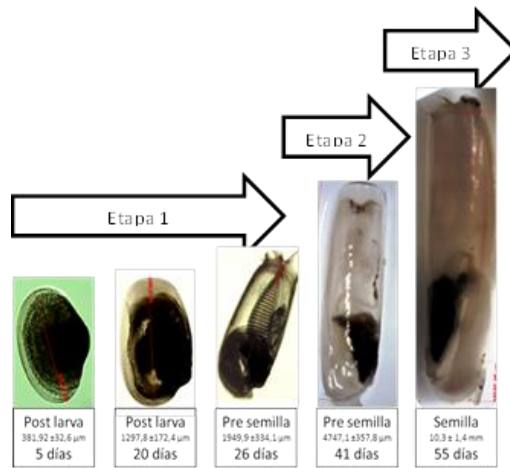


Figura 5. Desarrollo post larval de navaja (*Ensis macha*) en sistema de cultivo semi controlado, indicando tiempo en días, post asentamiento y talla promedio de mayor longitud valvar observada. Fotos Fundación Chile.

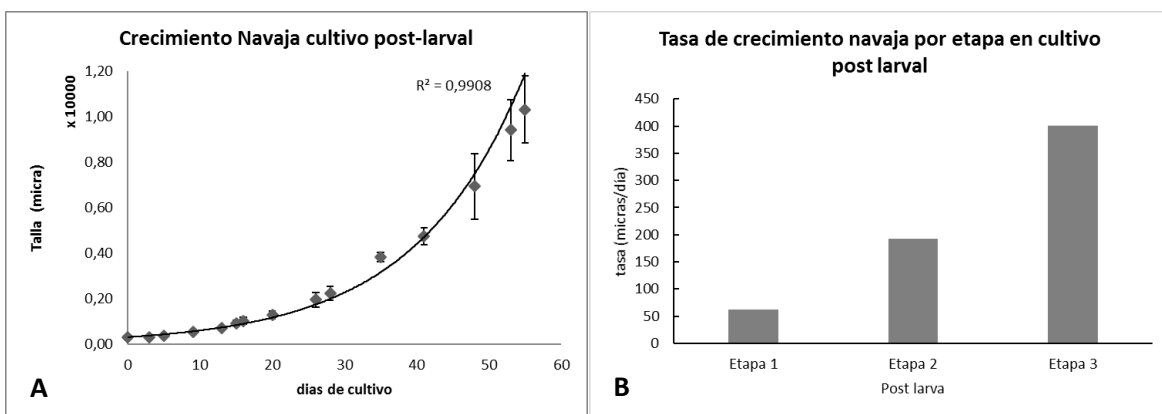


Figura 6. A: Curva de crecimiento en etapa post larval de navaja en ambiente semi controlado y B: tasa de crecimiento en distintas etapas del cultivo post larval. Datos Fundación Chile.