

Programa de doctorado en biología marina y acuicultura

Tesis doctoral

2012



Caracterización genética de poblaciones de
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) en Asturias,
Galicia y Canarias y desarrollo de sistemas de
cultivo en batea.

Noelia Tourón Besada



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y biología molecular

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE
PARACENTROTUS LIVIDUS (LAMARCK, 1816) EN
ASTURIAS, GALICIA Y CANARIAS Y DESARROLLO DE
SISTEMAS DE CULTIVO EN BATEA.**

Memoria que para optar al Grado de Doctora en Biología Marina y Acuicultura,
presenta

NOELIA TOURÓN BESADA

Santiago de Compostela, España, 2012



Manuel Rey Méndez, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, e Iria Fernández Silva, investigadora del Hawaii Institute of Marine Biology,

INFORMAN:

Que la memoria titulada “Caracterización genética de poblaciones de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en Asturias, Galicia y Canarias y desarrollo de sistemas de cultivo en batea.” que presenta Dña. Noelia Tourón Besada para optar al grado de Doctora en Biología Marina y Acuicultura, fue realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del edificio CIBUS. Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizamos su presentación.

Santiago de Compostela a 16 de noviembre del año dos mil doce.

Doctorando

Directores

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Noelia', written in a cursive style.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Manuel', written in a cursive style.

Noelia Tourón Besada

Manuel Rey Méndez

Iria Fernández Silva

a mis PADRES

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de investigación no sería posible sin el apoyo y la financiación de la Junta Asesora de Cultivos Marinos: JACUMAR, que coordina además la colaboración entre las comunidades autónomas de Galicia, Asturias y Canarias, las cuales trabajan conjuntamente para la consecución de los objetivos finales que se plantean en el proyecto **Cultivo y gestión del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)**. Agradecemos la cesión de algunas de las fotografías presentadas en este trabajo a D. José Luís Catoira, D. César Lodeiros y en especial a D. Manuel Rey, cuya colaboración en la realización de este trabajo ha sido inestimable.

Me faltan las palabras para expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible que este trabajo viera la luz. A Manuel Rey Méndez, por la oportunidad que me brindó de trabajar en el departamento de bioquímica en el que tanto aprendí, por su paciencia y su apoyo constantes, sin los cuales nada de esto sería posible.

A Iria Fernández-Silva, por abrirme las puertas del maravilloso mundo de la genética, por todas sus enseñanzas y sus palabras de ánimo.

A Jorge Rodríguez Castro por ser una luz en todos estos años de camino, gracias por compartir con nosotros tantos conocimientos, por implicarte en el trabajo de los demás como si fuera el tuyo, por tu increíble voluntad de trabajo, por ser siempre el rostro amable que hace más llevaderas todas las dificultades.

A Ángel por su ayuda con la estadística, a Javier, Lois, Belén, Lara, etc.; gracias a todos por vuestro compañerismo y apoyo, por hacer muy amenos los días en el laboratorio.

A mis padres, vosotros que volcasteis en mí todo el amor y la comprensión de este mundo, gracias por vuestra paciencia infinita y por el apoyo constante que siempre me hicisteis sentir, gracias por guiar mis pasos en esta senda de la vida, por creer siempre en mi y alentarme en la persecución de mis sueños.

A mi hermana y a mis abuelos, por sus continuas palabras de ánimo y su cariño.

A Berto, gracias por tu amor y por los platos deliciosos que me tenías siempre preparados.

A Vero, Javi, Vivian, Iria, Carlos, Bea, Fran, Fer, Moncha, Montse, Silvia, Claudio, Ezequiel, Yari, Enri, Lester, Ben... a todos los que me regalaron su amistad y su cariño.

Millones de gracias de todo corazón!!!

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	13
<u>1.1. La especie objeto de estudio: <i>Paracentrotus lividus</i></u>	15
1.1.1. Taxonomía	15
1.1.1.1. Sistemática	15
1.1.1.2. Evolución	16
1.1.2. Descripción	23
1.1.2.1. Anatomía	23
1.1.2.2. Composición bioquímica	27
1.1.3. Hábitat. Distribución	28
1.1.4. Reproducción	30
1.1.5. Alimentación	34
1.1.6. Desarrollo	35
1.1.7. Importancia económica	36
1.1.7.1. Producción y consumo	36
1.1.7.2. Gastronomía e información nutricional	41
1.1.7.3. Cultivo	43
1.1.7.4. Diseño de dietas experimentales	48
<u>1.2. Crecimiento de <i>Paracentrotus lividus</i></u>	50
1.2.1. Desarrollo y crecimiento	50
1.2.2. Tipos de crecimiento	52
1.2.3. Modelos de crecimiento y métodos de estudio	54
1.2.3.1. Modelo de crecimiento exponencial o ecuación malthusiana	54
1.2.3.2. Modelo logístico o dependiente de la densidad	55
1.2.3.3. Modelo de Gompertz	56
1.2.3.4. Modelo de Brody-Bertalanffy o de Von Bertalanffy	56
1.2.3.5. Modelo de Richards	57
1.2.4. Factores que regulan el crecimiento	58
<u>1.3. Genética molecular y ecología</u>	58
1.3.1. Genética molecular	58
1.3.2. ¿Qué es un marcador molecular?	59
1.3.3. Desarrollo de marcadores moleculares	59
1.3.3.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)	60
1.3.3.2. MAAP (Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación)	60
1.3.4. Ventajas y aplicaciones de los microsatélites	63
1.3.5. Diversidad genética	64
1.3.5.1. Definición de población	64
1.3.5.2. Equilibrio Hardy-Weinberg	65
1.3.5.3. Diversidad genética. Estimadores	66
1.3.6. Flujo génico y deriva genética	67
2. OBJETIVOS GENERALES	71
3. MATERIALES Y MÉTODOS	75

<u>3.1. Instalaciones e infraestructuras de cultivo</u>	77
<u>3.2. Obtención del material biológico para las diferentes experiencias</u>	78
3.2.1. Erizos juveniles del medio natural	78
3.2.2. Erizos juveniles procedentes de criadero	80
3.2.3. Erizos de tamaño comercial	81
3.2.3.1. Engorde de gónadas. Experiencia preliminar.....	81
3.2.3.2. Engorde de gónadas.....	82
3.2.4. Erizos para estudios poblacionales	83
3.2.4.1. Estudio de diferenciación genética de muestras mediante RAPDs (Random Amplified Polimorphyc DNA) y secuenciación de ADN mitocondrial para el estudio poblacional de <i>P. lividus</i>	83
3.2.5. Algas	87
<u>3.3. Metodología de los análisis genéticos</u>	87
3.3.1. Análisis preliminar de la diferenciación genética de poblaciones de erizo de mar, <i>P. lividus</i>, a partir de RAPDs	87
3.3.1.1. Aislamiento del ADN.....	87
3.3.1.2. Análisis genéticos mediante RAPDs.....	87
3.3.2. Diferenciación genética de poblaciones de <i>P. lividus</i> procedentes de Asturias, Canarias y Galicia mediante secuenciación	88
3.3.2.1. Aislamiento del ADN.....	88
3.3.2.2. Amplificación del ADN mediante PCR.....	88
3.3.2.3. Verificación de los productos de PCR.....	89
3.3.2.4. Secuenciación de los productos de PCR.....	89
<u>3.4. Toma de datos y tratamiento estadístico</u>	90
3.4.1. Engorde de erizos juveniles procedentes del medio natural	91
3.4.2. Engorde de erizos juveniles procedentes de cultivo	91
3.4.3. Erizos de tamaño comercial	92
3.4.3.1. Engorde de gónadas. Experiencia preliminar.....	92
3.4.3.2. Engorde de gónadas.....	93
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	95
<u>4.1. Puesta a punto del manejo y confinamiento de <i>P. lividus</i> en batea</u>	97
4.1.1. Diseño y desarrollo de estructuras de cultivo en batea	97
4.1.2. Experiencia inicial de adaptación de los erizos al cultivo	100
4.1.3. Diseño y elaboración de piensos experimentales	103
<u>4.2. Efecto de diferentes dietas y densidades sobre el crecimiento de juveniles de <i>P. lividus</i> obtenidos del medio natural</u>	105
4.2.1. Objetivo	105
4.2.2. Materiales y métodos	106
4.2.3. Resultados y discusión	109
4.2.3.1. Evolución del peso de los erizos con cada tipo de alimentación.....	111
4.2.3.2. Evolución del diámetro de los erizos con cada tipo de alimentación.....	114
4.2.3.3. Evolución de la altura de los erizos con cada tipo de alimentación.....	117
4.2.3.4. Análisis de los datos.....	121
4.2.4. Conclusiones	148

<u>4.3. Crecimiento de juveniles de <i>P. lividus</i> obtenidos en criadero, Alimentados con algas</u>	149
4.3.1. Objetivo	149
4.3.2. Materiales y métodos	149
4.3.3. Resultados y discusión	152
4.3.3.1. Evolución del peso y del diámetro de los erizos juveniles procedentes de criadero	152
4.3.3.2. Tratamiento estadístico	155
4.3.4. Conclusiones	164
<u>4.4. Efecto de diferentes dietas experimentales sobre el índice gonadal de <i>P. lividus</i></u>	164
4.4.1. Objetivo	164
4.4.2. Materiales y métodos	164
4.4.2.1. Engorde de gónadas. Experiencia preliminar	165
4.4.2.2. Engorde de gónadas	166
4.4.3. Resultados y discusión	169
4.4.3.1. Experiencia preliminar	169
4.4.3.2. Análisis estadístico de los datos	171
4.4.3.3. Engorde de gónadas	175
4.4.3.4. Análisis estadístico de los datos	177
4.4.4. Conclusiones	182
<u>4.5. Análisis preliminar de la diferenciación genética de poblaciones de erizo de mar, <i>P. lividus</i>, a partir de RAPDs</u>	183
4.5.1. Objetivo	183
4.5.2. Materiales y métodos	183
4.5.2.1. Muestreo	183
4.5.2.2. Análisis de datos	183
4.5.3. Resultados y discusión	184
4.5.4. Conclusiones	189
<u>4.6. Estudio de poblaciones de <i>P. lividus</i> mediante secuenciación del gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI)</u>	189
4.6.1. Objetivo	189
4.6.2. Manteriales y métodos	190
4.6.2.1. Electroforesis y detección de los productos de secuenciación	190
4.6.2.2. Caracterización de secuencias	190
4.6.2.3. Diversidad haplotípica	192
4.6.3. Resultados y discusión	192
4.6.3.1. Estructura poblacional	192
4.6.3.2. Diversidad haplotípica	197
4.6.4. Conclusiones	201
5. DISCUSIÓN GENERAL	203
6. CONCLUSIONES GENERALES	213
7. BIBLIOGRAFÍA	217

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La especie objeto de estudio: *Paracentrotus lividus*.

1.1.1. Taxonomía.

Los erizos de mar son equinodermos que ocupan la franja costera desde la zona intermareal hasta profundidades de 150 metros, a lo largo de todo el mundo. Los equinodermos poseen simetría pentarradial secundaria y un sistema vascular acuífero característico. El cuerpo de los equinoideos está totalmente cubierto de púas. Su caparazón calcáreo está compuesto por la fusión de varias placas, cuyo conjunto se denomina “testa”. La palabra de origen griego equinodermo, significa piel espinosa (equinos: espinas y derma: piel). El erizo de mar del que se ocupa este trabajo, *Paracentrotus lividus*, es conocido por diversos nombres como *Strongylocentrotus lividus* (A. Agassiz, 1872), *Echinus lividus* (Lamarck, 1816), *Echinus saxatilis* (Tiedemann, 1816), *Echinus vulgaris* (Blainville, 1825), *Echinus purpureus* (Risso, 1826), *Toxopneustes lividus* (Heller, 1868), *Toxopneustes concavus* (L. Agassiz & Desor, 1846), *Toxopneustes complanatus* (L. Agassiz & Desor, 1846), *Microcordyla asteriae* (Zirpolo, 1927) o *Toxocidaris livida* (Lamarck, 1816), si bien el más aceptado de forma general es el que se utiliza en el título de este trabajo, establecido por Lamarck en 1816.

1.1.1.1. Sistemática.

PHYLUM	Echinodermata
SUBPHYLA	Echinozoa
CLASE	Echinoidea
SUBCLASE	Euechinoidea
SUPERORDEN	Echinacea
ORDEN	Echinoida
FAMILIA	Echinidae
GÉNERO	Paracentrotus
ESPECIE	<i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)

Los equinodermos se subdividen tradicionalmente en dos subfilos y cinco clases:

- **Subfilo Pelmatozoa.** Equinodermos inmóviles.

Clase Crinoidea. También denominados comátulas o lirios de mar por su aspecto vegetal, unas 625 especies.

- **Subfilo Eleutherozoa.** Equinodermos móviles.

Clase Asteroidea. Estrellas de mar, unas 1.500 especies.

Clase Ophiuroidea. Ofiuras, unas 2.000 especies.

Clase Echinoidea. Erizos de mar, unas 950 especies.

Clase Holothuroidea. Pepinos de mar, unas 1.150 especies.

Clase Concentricycloidea. También se conocen como margaritas de mar. Está compuesta por un género y dos especies de reciente descubrimiento (Baker, 1986) y su posición sistemática no está clara.

1.1.1.2. Evolución.

Los equinodermos, de los que se conocen unas 6.000 especies actuales y 13.000 especies extintas aproximadamente, son uno de los grupos animales mejor representados en el registro fósil. El equinodermo más antiguo aceptado de forma general procede del Cámbrico, hace unos 540 millones de años; se reconocieron como taxón independiente por primera vez en 1847. La hipótesis mayoritaria, basándose en la existencia de larvas con simetría bilateral, defiende que los equinodermos ancestrales presentaban dicha simetría y su celoma estaba formado por tres regiones o trómeros. La simetría pentarradial se considera una forma de adaptación a un modo de vida sésil, debido a lo cual la creencia más extendida es que los equinodermos libres derivarían de ancestros con una forma de vida fija. Los crinoideos y los ya extintos, *Cystoidea*, vivieron fijados al sustrato por un pedúnculo aboral en etapas primitivas, por lo que se cree que la liberación de uno de estos ancestros pudo dar origen posteriormente a los asteroideos, ofiuroideos, holoturoideos y equinoideos.

Las primeras especies de erizos de mar aparecieron hace unos 200 millones de años, aunque los primeros fósiles de equinodermos aparecen en el Cámbrico, hace

aproximadamente 500 millones de años (Bottjer *et al.*, 2006). Su uso como producto alimenticio data del Neolítico, la primera referencia escrita del consumo humano de erizos de mar la encontramos en manuscritos realizados por Aristóteles, que atestiguan la importancia de los erizos como alimento. La especie más importante económicamente en Europa occidental es *Paracentrotus lividus*. (Lustres Pérez, 2006).

En la figura 1-1 se presenta el cladograma filogenético más probable en la evolución de los equinodermos.

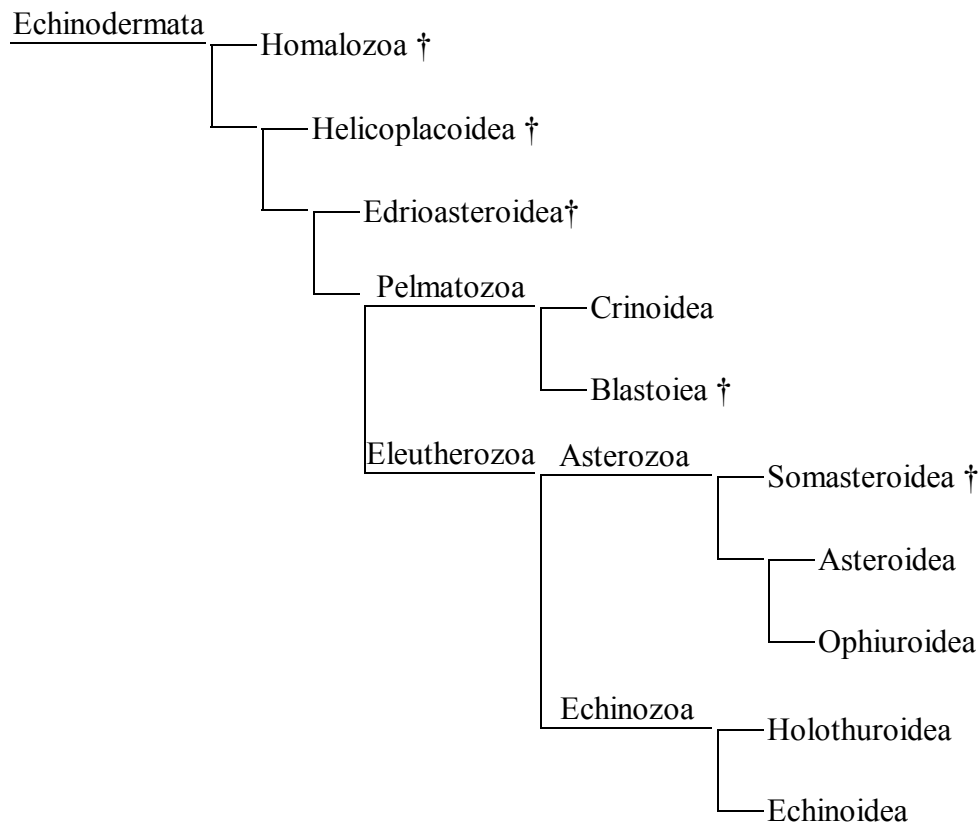


Figura 1-1.- Cladograma que muestra las posibles relaciones filogenéticas de los principales grupos de equinodermos. Confeccionado a partir de los datos de: Mooi & David, 1997, 1998; Littelwood *et al.*, 1997, Sprinkle, 1997 y Sumrall *et al.*, 1997.

Actualmente no existe una clasificación filogenética aceptada de forma general y es posible que esta clasificación se modifique a medida que aumenten los conocimientos filogenéticos sobre determinados grupos fósiles. Aunque los equinodermos aparecen por primera vez en el Cámbrico Inferior, no son muy abundantes hasta el periodo Carbonífero y los fósiles que se encuentran aparecen desarticulados, los osículos están

desorganizados y no nos revelan la organización del esqueleto (Sumrall, 1997; Zamora, 2011). Se cree que dos de los fósiles encontrados en el Precámbrico, *Tribrachidium* y *Arkarua*, pueden ser los ancestros de los equinodermos Cámbricos por su simetría radial y su parecido con los edrioasteroideos (Rivas, 2009).

A finales del periodo Paleozoico (ver tabla 1-1) tuvo lugar una gran extinción de equinodermos que se fueron recuperando progresivamente durante el periodo Mesozoico; a partir del Terciario se va consolidando su expansión hasta la actualidad (Sprinkle & Guensburg, 1997). Los individuos pertenecientes a la Clase Echinoidea o equínidos fueron poco numerosos en el periodo Paleozoico. Los equínidos primarios se caracterizaban por presentar más de 20 filas de placas coronales, exceptuando a *Boihriocidaris* (Ordovícico Superior), que presenta 15 filas de placas (Mooi & David, 1998). Durante el periodo Carbonífero se produjo una explosión demográfica acompañada por la aparición de nuevos géneros como *Archaeocidaris* (Fig. 1-2).

Al final del Paleozoico se produjo una gran extinción de equínidos, siendo el género *Miocidaris* el único que sobrevivió al periodo Pérmico. Durante el periodo Triásico aparecen los Euequínidos. Tanto los regulares (con placas ambulacrales compuestas) como los irregulares proceden de un antepasado común “cidaroide”. Los restos de los equínidos irregulares encontrados hasta la fecha indican que aparecen en el Jurásico Inferior o Liásico y su número se expande durante el Jurásico Superior y el Cretácico; estos equínidos son anatómicamente muy similares a los contemporáneos que presentan forma regular, excepto por la posición excéntrica del ano.

Durante la era Mesozoica la mayor abundancia de equínidos la encontramos en rocas calcáreas. En el periodo Jurásico Medio aparece el género *Clypeus* en grandes cantidades, tanto es así que los restos de su caparazón mezclados con la roca caliza reciben el nombre de “arena de *Clypeus*”.

Los equínidos continúan proliferando durante el Cretácico Superior y durante la era Cenozoica son abundantes en algunas zonas geográficas, especialmente las formas irregulares.

Tabla 1-1.- Representación de los periodos geológicos de la tierra. Tomado de: www.astromia.com.

Edad (años)	Eon	Era	Periodo	Época
4.500.000.000	Precámbrico	Azoica		
3.800.000.000		Arcaica		
2.500.000.000		Proterozoica		
560.000.000	Fanerozoico	Paleozoica	Cámbrico	
510.000.000			Ordovícico	
438.000.000			Silúrico	
408.000.000			Devónico	
360.000.000			Carbonífero	
286.000.000			Pérmico	
248.000.000		Mesozoica	Triásico	
213.000.000			Jurásico	
144.000.000			Cretácico	
65.000.000		Cenozoica	Terciaria	Paleoceno
56.500.000				Eoceno
35.400.000				Oligoceno
24.000.000				Mioceno
5.200.000				Plioceno
1.600.000			Cuaternaria	Pleistoceno
10.000				Holoceno



Figura 1-2.- Género Archaeocidaris. Tomado de: www.proctomuseum.us.

En resumen, podemos dividir la evolución de los equinodermos en dos periodos bien diferenciados separados por la gran extinción que se produjo a finales del periodo Paleozoico. Centrándonos más específicamente en los equínidos, podemos dividirlos a su vez en paleozoicos y post-paleozoicos, debido a una serie de características comunes que presentan en cada uno de estos periodos. Los equínidos paleozoicos tenían formas regulares, con una corona que presentaba más de veinte filas de placas, éstas podían estar imbricadas entre sí, lo cual nos lleva a pensar en la posibilidad de un caparazón flexible. Dentro de los equínidos de este periodo cabe destacar el orden Cidaroida, al que pertenece el género *Miocidaris*, que es el primero de los géneros conocidos que posee apófisis auriculares y veinte filas de placas en la corona, además de sobrevivir a la extinción que tuvo lugar a finales del Pérmico. Actualmente no se cree que de él deriven los equínidos post-paleozoicos, sino que los cidaroides y euequinoideos se separaron antes de su aparición (Smith & Hollingworth, 1990). Dentro de este orden se encuentra también el género *Archaeocidaris*, cuyo caparazón era flexible. Este orden Cidaroida continúa existiendo durante el periodo post-paleozoico, aunque en este periodo el orden predominante es el de los euequinoideos, que aparecen al principio del Mesozoico.

Dentro del orden Cidaroida encontramos también el género *Cidaris* (Fig. 1-3), que llega desde el Jurásico hasta nuestros días y vive actualmente en aguas cálidas, posee un caparazón hemisférico, achatado por los polos, con un sistema apical relativamente grande al compararlo con el diámetro del caparazón; las placas interambulacrales presentan un tubérculo primario muy grande, rodeado por otros de menor tamaño; los ambulacros tienen placas simples y son estrechos, presenta mandíbulas y apófisis auriculares y sus espinas son de gran tamaño.

Los equínidos del periodo post-paleozoico siguen una tendencia evolutiva de yuxtaposición de las placas (presentan veinte filas de placas en la corona) y la formación de un caparazón rígido (Rivas, 2009). El orden Cidaroida está formado por equínidos regulares, no tienen branquias y sus placas ambulacrales son simples; los euequinoideos sin embargo, que son el género mayoritario durante este periodo, presentan tanto formas irregulares como formas regulares con branquias y placas ambulacrales compuestas.

Dentro del orden Euequinoidea encontramos individuos tanto de forma regular como irregular (Pawson, 2007).

a) **Forma regular:** el más representativo es el género *Hemicidaris* (Fig. 1-3), perteneciente al orden Hemicidaroida, que existió desde el Triásico Superior hasta el Cretácico Superior, su caparazón es hemisférico con ambulacros estrechos, las placas de su cara oral son compuestas, diadematoides, formadas por la fusión de dos a cuatro placas, al contrario que las del polo aboral que son simples. Las placas interambulacrales presentan tubérculos primarios perforados con otros pequeños a su alrededor y las espinas son largas y delgadas. Los tubérculos por lo general son crenulados.

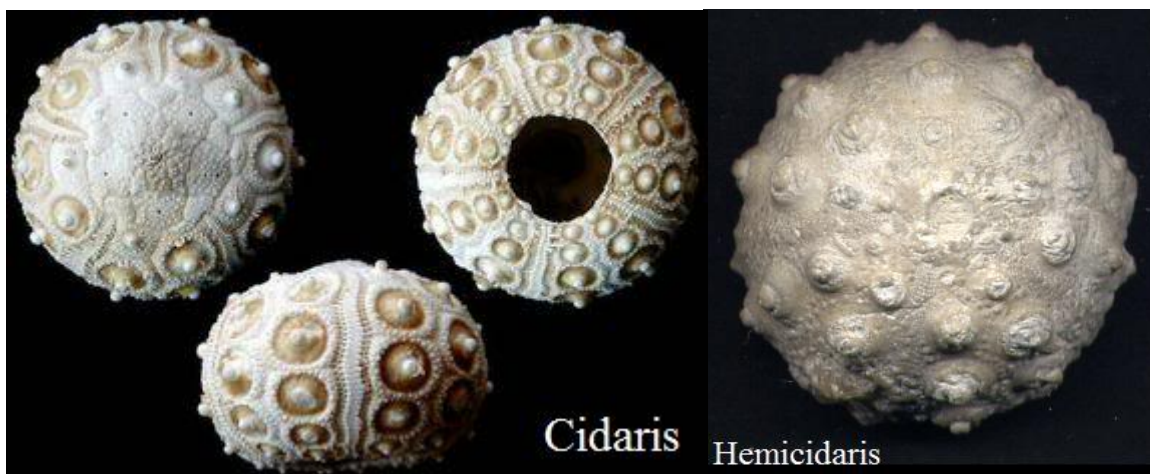


Figura 1-3.- Géneros *Cidaris* y *Hemicidaris*. Tomado de: www.proctomuseum.us.

b) **Forma irregular:** dentro de la formas irregulares también podemos distinguir entre dos tipos de individuos:

Boca central con mandíbulas: cabe destacar el *Plesiechinus*, que existió durante el Triásico Superior, sus ambulacros presentan placas simples con poros redondos, el esqueleto es pentagonal y aplastado, presenta un sistema apical muy grande con el ano en su borde posterior. El *Holectypus* es similar al *Plesiechinus* con la diferencia de que el ano se encuentra en el polo oral, el orden *Holectypoida* aparece desde el Jurásico Inferior hasta la actualidad.

Boca cerca del margen anterior: dentro de este grupo encontramos varios géneros como *Nucleolites*, *Clypeus* (Fig. 1-4), *Echinocoris*, *Holaster*, este último es muy similar al *Echinocorys*, del cual se distingue por su caparazón en forma de corazón,

y por último el *Micraster* (Fig. 1-4), que vive durante el Cretácico Medio y Superior y es el más importante de todos ellos debido a que sufre una serie de modificaciones, durante el Cretácico Superior, que suponen una adaptación evolutiva y además proporcionan datos estratigráficos esclarecedores. Se han encontrado ejemplares en niveles superiores e inferiores del sustrato que presentan diferencias considerables, por lo que se han considerado especies diferentes, sin embargo, los fósiles de las capas intermedias manifiestan cambios graduales, caracteres de transición entre estas dos especies. Los principales cambios que determinan la evolución de esta especie son: aumento del tamaño del caparazón tanto en altura como en anchura, profundización del surco anterior que conduce a la boca, alargamiento de los pétalos, la superficie de las placas que se encuentran entre los pares de poros se vuelve rugosa cuando era lisa inicialmente, desplazamiento de la boca hacia la zona anterior y aparición de un labro desarrollado, aumento de la anchura de la fasciola subanal, los tubérculos del plastron se vuelven toscos.



Figura 1-4.- Géneros *Clypeus* y *Micraster*. Tomado de www.proctomuseum.us.

Durante el Cretácico Superior el género *Micraster* presenta unos caracteres relativamente uniformes, no se aprecian en él cambios significativos por lo que parece razonable suponer que la evolución de *Micraster* corresponde a su adaptación a un determinado modo de vida, concretamente al enterramiento en los sedimentos del periodo Cretácico, dando origen en la actualidad a los equínidos con forma de “corazón” como el género *Echinocardium*.

1.1.2. Descripción.

1.1.2.1. Anatomía.

Los equinodermos son organismos metazoos, triblásticos, enterocelomados, deuteróstomos y de vida exclusivamente marina. *Paracentrotus lividus* pertenece al grupo de los equinodermos regulares, al presentar su cuerpo simetría pentarradial. El nombre echinoidea, que significa "como un erizo", se debe al hecho de que estos animales están cubiertos de espinas. La característica anatómica más evidente del erizo de mar es su caparazón externo, de forma más o menos esférica, achatado en los polos, formado por la fusión de placas calcáreas que se unen para constituir una caja sólida. Este caparazón tiene la ventaja de proporcionar a los erizos una protección total, pero también presenta inconvenientes como la reducción considerable de la movilidad, además de ser una estructura bastante pesada. Sin embargo, este inconveniente se ve compensado por la capacidad que presentan todos los equinodermos de poder ablandar y endurecer su tejido conectivo (Szulgit & Shadwick, 1994). Este tejido de la dermis puede comportarse como un caparazón rígido en estado contraído, pero al pasar a su estado relajado permite una amplia deformación del cuerpo además de una gran movilidad del individuo (Míguez, 2009). El funcionamiento del tejido conectivo variable se basaría fundamentalmente en la concentración de iones calcio, según una hipótesis planteada por Wilkie en 1984; según este autor las fibras de colágeno están interconectadas por glicoproteínas asociadas a células yuxtaligamentarias que controlan la concentración extracelular de iones calcio. Estos iones funcionarían como puente electrostático entre las cadenas laterales de oligosacáridos de las moléculas de glicoproteína, de tal manera que una concentración elevada de los mismos supondría mayor rigidez en el tejido, mientras que un descenso en la concentración de iones calcio y por lo tanto un aumento en la concentración de iones sodio, que los sustituirían, supondría una relajación de los tejidos que pasarían a un estado de baja viscosidad. Este sistema representa una mejoría notable en la movilidad de los erizos, permitiéndoles tensar la musculatura de las púas para realizar todo tipo de movimientos.

El cuerpo de los erizos (Fig. 1-5) puede dividirse en dos polos o hemisferios, uno bucal u oral y otro aboral, con las partes dispuestas radialmente en torno al eje polar; en el polo oral se encuentra la boca que se halla rodeada por una membrana llamada

peristomio, la cual está en contacto permanente con el sustrato; en el polo aboral se encuentra la región anal, conocida como periprocto. Este caparazón presenta simetría pentarradial y las placas que lo constituyen se dividen en ambulacrales e interambulacrales.

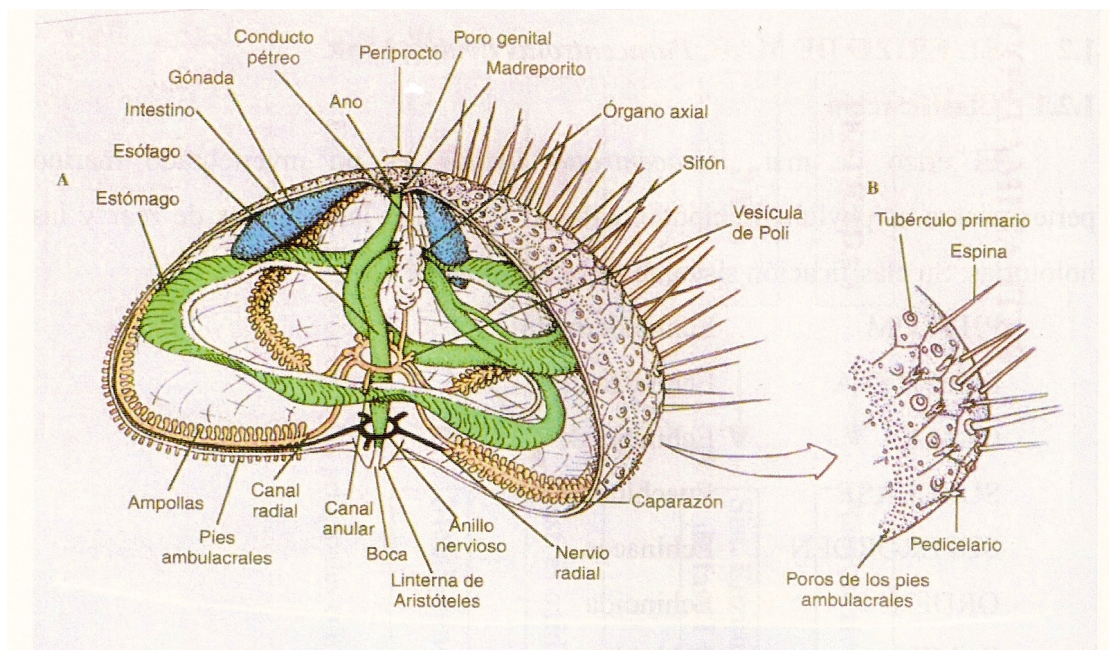


Figura 1-5.- Anatomía interna del erizo de mar. Tomado de: Montero Torreiro (2000).

La superficie externa del exoesqueleto está cubierta por una epidermis ciliada, de la que salen las espinas que cubren el caparazón de forma radial. Debajo de la epidermis se aprecia una dermis de tejido conectivo derivada del mesodermo, que contiene el esqueleto, el cual está compuesto por placas aplanadas de naturaleza calcárea que se fusionan para dar origen a un caparazón sólido e inmóvil; además encontramos una serie de pies ambulacrales que salen de unos pequeños poros distribuidos por la superficie de las placas de igual nombre. Las placas que no tienen poros, llamadas interradales, se encuentran cubiertas de púas o pínulas. Tanto las espinas como los pies ambulacrales, dispuestos en cinco secciones del caparazón, pueden moverse en todas las direcciones; estos últimos se comportan a modo de ventosa, adhiriéndose o desprendiéndose del sustrato gracias a cambios de presión en el interior de la ventosa situada en la parte externa del pie (podio), y sirviendo por lo tanto para desempeñar diversas funciones; actúan como mecanismo de fijación al sustrato durante la

locomoción, participan en el intercambio gaseoso, la alimentación y la percepción sensorial. Esta propiedad se la confiere el sistema vascular acuífero interno, también llamado aparato ambulacral, que constituye el aparato circulatorio de los erizos. Se trata de un complejo sistema de conductos y reservorios llenos de líquido celómico que actúa transportando los alimentos y los materiales de desecho, además de servir de soporte al aparato locomotor. El sistema vascular acuífero se abre al exterior a través del madreporito o placa madreporica, el líquido que recorre el sistema ambulacral es similar al agua de mar exceptuando la presencia de celomocitos, proteínas y una mayor concentración de iones potasio.

Los erizos de mar presentan además una ausencia de cefalización ya que su sistema nervioso es muy simple, no tienen cerebro. Poseen cinco pares de branquias que representan los centros más importantes de intercambio gaseoso. Todos los erizos de mar poseen un aparato masticador altamente desarrollado llamado linterna de Aristóteles, donde los alimentos son desgarrados y triturados, que se proyecta ligeramente a través de la boca. Se compone de cinco grandes placas calcáreas llamadas pirámides, cada una de las cuales tiene forma de cabeza de flecha con púas, cuya punta se proyecta hacia la boca. Los principales músculos que forman parte de esta estructura se dividen en cuatro grupos: depresores, elevadores, protractores y tractores; se ha realizado un estudio para analizar su origen y desarrollo (Dolmatov *et al.*, 2007). Este trabajo empleó la microscopía electrónica de transmisión para estudiar los cambios estructurales que se producen durante la transición del individuo juvenil al adulto en el erizo de mar *Strongylocentrotus nudus*, sugiriendo que la miogénesis de los cuatro grupos musculares de la linterna implica cuatro etapas consecutivas. Durante la etapa inicial, los músculos aparecen como un mesentéreo delimitado por epitelio celómico pseudoestratificado, compuesto por células peritoneales que se disponen a lo largo del epitelio, y por células mioepiteliales que forman racimos y ocupan los intersticios que quedan entre las células anteriores. En la siguiente etapa, estos racimos se “hunden” ligeramente en el tejido conectivo subyacente. Durante la tercera etapa de muscularización, las células mioepiteliales aumentan de tamaño, invadiendo el tejido conectivo y dividiendo al mioepitelio en dos capas, una superior peritoneal y una masa más profunda de células mioepiteliales sumergidas en el tejido conectivo; estas dos capas están unidas por una lámina basal continua.

Finalmente se produce la última etapa de la miogénesis, en la cual los miocitos se separan completamente del epitelio para formar bultos de músculo subepitelial.

En el interior de la linterna de Aristóteles se encuentran la cavidad bucal y la faringe, la cual asciende por este aparato y se continúa con el esófago. Este último órgano desciende a lo largo del borde externo de la linterna y se une al intestino. El intestino es muy largo y puede dividirse en un intestino delgado proximal y otro grueso distal. Este último se une al recto, que desemboca en el ano situado en el periprocto. En todos los equinoideos, el aparato digestivo se halla revestido de epitelio cilíndrico ciliado. Constituye esta linterna una estructura sumamente eficaz para la masticación, pero la alimentación no es rápida, ya que el consumo de un manojo de algas marinas puede prolongarse durante semanas. Además de la linterna de Aristóteles, los pies tubulares también participan en la captura del alimento, proporcionando movilidad al erizo.

La digestión extracelular se inicia al incluir el alimento en una película de mucus poroso, lo cual facilita su absorción y digestión (Lawrence & Lane, 1982). Para que dé comienzo esta digestión extracelular se activan los celomocitos, que son los encargados de desintegrar el alimento, liberar enzimas y transferir el alimento fagocitado a una ceca pilórica, la cual está conectada a su vez con un estómago cardiaco, donde se lleva a cabo la digestión y la absorción final por parte del epitelio (Bamford, 1982).

Los vasos sanguíneos están en conexión con lagunas o senos, por tanto, se trata de un aparato circulatorio abierto, carecen de corazón. El sistema nervioso está compuesto por el anillo circumbucal, que rodea la faringe por dentro de la linterna de Aristóteles. Los nervios radiales pasan entre las pirámides de la linterna y discurren a lo largo del lado inferior del caparazón. Cada nervio radial emite una rama para cada uno de los pies, y cada nervio pedal termina en una red nerviosa en la región de la ventosa. Otros nervios que nacen del radial penetran también en el caparazón y proporcionan a los pedicelarios y a las espinas una red nerviosa.

1.1.2.2. Composición bioquímica.

Se sabe que *Paracentrotus lividus* presenta un ciclo gonadal anual en las costas gallegas, con un único desove entre junio y agosto (Fernández *et al.*, 2006), este ciclo está estrechamente relacionado con la composición bioquímica de las gónadas del erizo, que varía también de forma estacional según la etapa reproductora en la que se encuentre el individuo (Byrne, 1990), aunque hay estudios en los que se baraja la posibilidad de que en algunas zonas atlánticas existan dos periodos de desove (Crapp & Willis, 1975). El componente mayoritario de las gónadas son las proteínas, que constituyen desde un 30 a un 60% del peso seco aproximadamente (Dincer & Cakli, 2007), coincidiendo sus valores máximos con los mínimos de hidratos de carbono y viceversa, por lo que se cree que estos últimos actúan como reserva energética y además proporcionan la energía necesaria para sintetizar proteínas. Los lípidos totales presentes en las gónadas no varían estacionalmente de forma tan evidente, siendo los triglicéridos el principal componente y apareciendo el colesterol total en una proporción siempre inferior al 1%. En las gónadas encontramos un nivel de triacilgliceroles notablemente más alto que en el intestino, porque parece claro que son las propias gónadas las que actúan como órganos de reserva de nutrientes en *P. lividus*, y la variación estacional de los componentes bioquímicos del contenido digestivo parecer ser debida únicamente a factores de tipo ambiental como la biodisponibilidad de alimento (Montero Torreiro, 2000). El contenido proteico del intestino de *P. lividus* varía entre un 24,1% y un 42%. El índice gonadal de *Paracentrotus lividus* presenta también una variación estacional, iniciando un crecimiento progresivo desde el mes de noviembre para alcanzar sus valores máximos en los meses de marzo y abril. A partir de junio comienza la disminución del índice gonadal que presenta su valor más bajo en el mes de agosto, iniciando una nueva etapa de crecimiento a partir de septiembre (Montero-Torreiro & García-Martínez, 2003). El estudio de Montero-Torreiro y García-Martínez revela además una correlación positiva entre el índice gonadal y la concentración de proteínas y de lípidos presentes en el intestino del erizo; existe también una correlación positiva entre la concentración total de lípidos en la gónada y los niveles de glucógeno en el intestino de *P. lividus*. Los niveles más altos de proteínas en las gónadas coinciden con los máximos valores del índice gonadal, lo cual demuestra la necesidad de proteínas durante la gametogénesis (Buckle *et al.*, 1978; Fernandez, 1998); por otra parte, la relación inversamente proporcional entre los niveles de glucógeno y proteínas en la

gónada de *P. lividus*, confirma el papel que ésta desempeña como sustancia de reserva (Lawrence *et al.*, 1966) de la que se obtiene la energía necesaria para la producción de gametos.

1.1.3. Hábitat. Distribución.

Los equinodermos son organismos exclusivamente marinos, la concentración salina de su medio interno debe ser igual a la del medio externo debido a que no poseen estructuras respiratorias, órganos excretores ni osmorreguladores. *Paracentrotus lividus* es un erizo de mar regular que adopta gran variedad de tonalidades, desde el blanco hasta el negro pasando por el lila, (color del que recibe el nombre de “lividus”), que se encuentra ampliamente distribuido en todo el litoral del Atlántico Norte, desde las costas de Escocia hasta Marruecos, así como en las costas del mar Mediterráneo, adentrándose en ellas hasta el mar Adriático, y en la costa de las Islas Canarias y Azores (Allain, 1972; Boudouresque & Verlaque, 2001); la abundancia máxima de esta especie se da a lo largo de las costas gallegas (Rodríguez-Bernaldo De Quirós *et al.*, 2001), encontrándose en una franja que abarca desde las charcas del mesolitoral hasta unos 30 m de profundidad en la zona sublitoral, aunque en Galicia pueden llegar hasta los 150 m de profundidad (Besteiro & Urgorri, 1988).

Los erizos de mar están adaptados para vivir principalmente sobre rocas y otros tipos de fondos duros (Fig. 1-6), pero puede encontrarse también en fondos arenosos sobre praderas de *Posidonia oceanica* en las costas del Mediterráneo y a grandes profundidades en zonas del Atlántico Norte (Tyler *et al.*, 1982). *Paracentrotus lividus* presenta una elevada plasticidad fenotípica, lo que le confiere un gran poder de adaptación al entorno (Fernandez & Boudouresque, 1997), aunque coloniza preferentemente superficies horizontales o de suaves pendientes (Bulleri *et al.*, 1999).

Existen evidencias de que esta especie puede realizar migraciones diurnas entre las superficies superior e inferior de las rocas (Fernandez *et al.*, 1995; Crook *et al.*, 2000; Barnes & Crook, 2001b). A nivel de ciclo circadiano, *Paracentrotus lividus* presenta una actividad fundamentalmente nocturna para evitar en lo posible a los predadores de



Figura 1-6.- Erizos en su hábitat natural. Costa de cabo Cee en la ensenada de Corcubión (Foto: M. Rey).

actividad diurna (Kempf, 1962; Gamble, 1965; Dance, 1987), sin embargo, se ha descubierto una población de *P. lividus* en Irlanda que se comporta de forma contraria, presentando actividad diurna debido probablemente a la abundancia de predadores nocturnos en la zona (Ebling *et al.*, 1966; Barnes & Crook, 2001a); además, la presencia de predadores puede influir en la actividad trófica de *P. lividus*, reduciéndola a un área de aproximadamente un metro cuadrado en torno a su refugio, lo cual evidencia que existen patrones de movimiento específicos en esta especie (Sala, 1996). Diversos estudios relacionan estos movimientos con la luz, la cual puede influir tanto en la dirección como en la velocidad de los mismos (Domenici *et al.*, 2003), aunque también se han realizado estudios que afirman que *P. lividus* se mueve en un área reducida realizando desplazamientos cortos y relativamente fortuitos (Dance, 1987), en el caso de los movimientos circadianos no suelen superar los 20 cm de desplazamiento (Hereu, 2004). El tamaño del erizo también influye en sus movimientos, los erizos de más de 50 mm de diámetro no suelen realizar migraciones debido a que su tamaño no les permite esconderse en los intersticios rocosos (Barnes & Crook, 2001b).

Los erizos tienden a buscar depresiones en las rocas donde refugiarse, siendo algunas especies capaces de aumentar la profundidad de tales depresiones. La excavación se ejecuta utilizando el aparato masticador y las espinas; estas últimas con sus movimientos giratorios desgastan y trituran las paredes de la madriguera. La conducta perforadora parece ser una adaptación para contrarrestar la acción de las olas en hábitats expuestos. *Paracentrotus lividus* acribilla literalmente las paredes de la roca con sus excavaciones y puede llegar a ocupar grandes extensiones de sustrato rocoso, creando verdaderos campos de erizos.

Los equinoideos suelen mostrar en general fototropismo negativo y tienden a buscar la sombra de las grietas en las rocas, cubriéndose incluso con fragmentos de algas, pequeñas piedras y conchas que mantienen adheridas a su caparazón para camuflarse, este fenómeno se denomina “covering” (Crook *et al.*, 1999; Verling *et al.*, 2004).

A pesar de su apariencia acorazada, el erizo también tiene sus depredadores naturales, entre los que se encuentran las estrellas de mar. Otros de sus enemigos son los cangrejos y los peces, en concreto sargos (*Diplodus sargus*) que son los mayores depredadores de los erizos adultos (Sala & Zabala, 1996), urtas (*Sparus auriga*) y cochinos (*Balistes carolinensis*) que con sus fuertes dientes pueden romper el caparazón fácilmente, también las langostas incluyen a los erizos en su dieta, aunque el depredador principal de los erizos es el hombre.

1.1.4. Reproducción.

Los equinoideos son dioicos, aunque no presentan dimorfismo sexual externo. Existen cinco gónadas adheridas a la cara interna del caparazón, a lo largo de las zonas interambulacrales (Gabín & Lorenzo, 1993). De cada gónada parte un gonoducto corto que se extiende aboralmente para abrirse por un gonoporo, localizado sobre una de las cinco placas genitales.

El desarrollo gonadal es un proceso controlado hormonalmente y de ciclo anual; existen varios autores que describieron las distintas etapas que conforman el desarrollo de la gónada de *P. lividus*: Byrne, 1990; Spirlet *et al.*, 1998; Sánchez-España *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2006; Barbaglio *et al.*, 2007, entre otros; en este trabajo usaremos la clasificación de Byrne, 1990. Según se describe en su estudio, existen seis estados

diferenciados de la gónada durante el desarrollo de la misma: estado I (recubrimiento), estado II (crecimiento), estado III (premadurez), estado IV (madurez), estado V (puesta) y estado VI (postpuesta).

El ciclo reproductivo de *P. lividus* en las costas de Galicia presenta un único desove anual que comienza a finales de la primavera (meses de marzo y abril) y se prolonga hasta el verano (julio y agosto); durante la etapa posterior al desove las gónadas se encuentran en estado VI o de postpuesta; después del verano se inicia un periodo de crecimiento principalmente somático, que se prolonga hasta los primeros meses del otoño, en esta etapa en los fagocitos nutritivos da comienzo un periodo de recubrimiento, las gónadas vacías después de la puesta empiezan a recuperarse almacenando sustancias de reserva y fagocitos nutritivos, pasando del estado VI al estado I, apareciendo los primeros ovocitos primarios dentro del ovario.

Así se empieza a incrementar nuevamente el índice gonadal (IG); a partir de este momento, aproximadamente durante el mes de octubre, se inicia la vitelogénesis en los ovocitos y la etapa de desarrollo gonadal o gametogénesis, en la que juegan un papel fundamental las sustancias de reserva acumuladas en forma de glucógeno (Walker *et al.*, 2001), que son transferidas desde las células nutritivas a las células gametogénicas, disminuyendo así el tejido de reserva a medida que maduran los ovocitos; esta etapa se prolonga hasta los meses de diciembre y enero, en ella las gónadas se encuentran en estado II, coincidiendo con el fotoperiodo más corto del año.

Generalmente durante el mes de febrero se produce una maduración de las células reproductivas del tejido gonadal, los ovocitos aumentan considerablemente su tamaño y empiezan a unirse, pasando al estado III o de premadurez, en esta etapa aparecen los primeros óvulos maduros mientras el tejido de reserva va desapareciendo; esta maduración de los ovocitos continúa hasta que éstos alcanzan su tamaño máximo, convirtiéndose en óvulos preparados para ser expulsados al medio externo, a partir de este momento la gónada se encuentra en estado IV o de madurez, los óvulos maduros migran hacia el centro del saco gonadal, almacenándose y llenando todo el espacio, el tejido nutritivo y los fagocitos prácticamente han desaparecido.

La evolución de la madurez de la gónada continúa progresivamente hasta alcanzar su punto álgido entre mayo y junio aproximadamente, presentando un estado V de puesta

durante el cual se produce el desove de la misma. Esta fase de puesta puede alcanzarse desde el estado IV o bien desde el estado III directamente, si ocurre esto último se produce una puesta parcial en la que los óvulos que alcanzan la madurez en la pared de la gónada salen directamente al medio externo sin almacenarse dentro del saco gonadal. Durante esta fase de puesta se pueden apreciar todavía óvulos maduros en la gónada, con abundantes espacios vacíos a su alrededor, el tejido de reserva ha desaparecido completamente.

Una vez realizada la puesta, las gónadas pasan a un estado VI o de postpuesta, durante el cual el ovario se encuentra casi vacío (Fig. 1-7), hacia el final de esta fase vuelve a aparecer el tejido de reserva y la pared de la gónada, que estaba muy delgada después de la puesta, empieza a recuperarse. Los óvulos que no han sido liberados son reabsorbidos por los fagocitos y la gónada pasa otra vez al estado I durante el que empiezan a aparecer de nuevo los primeros ovocitos, cerrándose así el ciclo anual. Esta glándula reproductora es el objeto de interés comercial de la especie, cuando alcanza la etapa de madurez puede llegar a alcanzar un 15% del peso fresco del erizo.

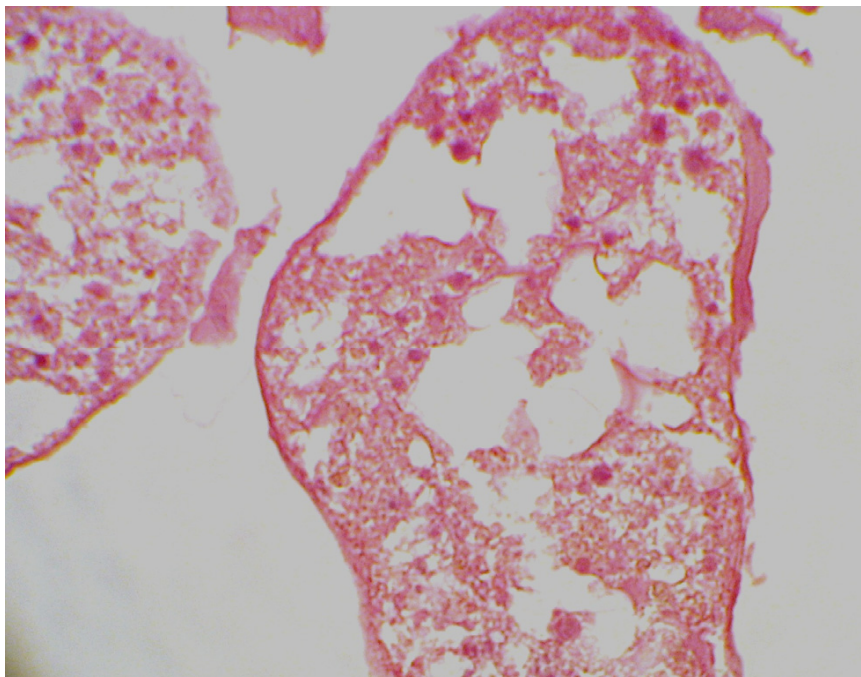


Figura 1-7.- Gónadas de erizo después del desove (estado VI), los huecos dejados por los ovocitos empiezan a rellenarse de nuevo con tejido de reserva. Tomado de: González-Irusta (2009).

La manipulación de la alimentación, la temperatura y del fotoperiodo, provoca el inicio de la gametogénesis fuera de estación (Hagen, 1998; Walker & Lesser, 1998; Spirlet *et*

al., 2000; Lawrence, 2007). En *P. lividus* el desarrollo gonadal se produce durante los meses más fríos del año y con fotoperiodo más corto, por lo que un incremento en la temperatura del agua puede servir de detonante para la liberación de los gametos (Byrne, 1990). Además el índice gonadal varía dependiendo de la estación, el biotopo (Kelly, 2000) y las condiciones tróficas (Régis, 1979; Semroud & Kada, 1987; Semroud, 1993; Guetaff & San Martin, 1995; Jacquin *et al.*, 2006; James, 2007), así como con la temperatura (Byrne, 1990), las condiciones hidrodinámicas (Fenaux, 1968), el fotoperiodo (Kirchhoff *et al.*, 2010) y los blooms de fitoplancton (Fenaux, 1968; Régis, 1979).

El desove principal de *Paracentrotus lividus* se produce generalmente en primavera y principios de verano (Míguez & Catoira, 1987; Catoira, 1995; Spirlet *et al.*, 1998; Ouréns, 2007), sin embargo, las fluctuaciones de determinados factores, pueden influir en que el inicio del periodo de desove se produzca no sólo a principios de la primavera sino incluso a finales del invierno. Por otra parte, tras el inicio de la puesta, los individuos de una población pueden presentar rápidas recuperaciones gonadales, que permiten que parte de ellos registren episodios de desove bien entrada la época estival (Pulpeiro *et al.*, 2001). Prueba de este fenómeno es el trabajo realizado por Ojea *et al.*, 2010, donde se estudia el ciclo gametogénico de *Paracentrotus lividus* en cuatro poblaciones gallegas: Cedeira, Reinante, Fisterra y Aguiño (Fig. 1-8). Se observan diferencias en el ciclo gametogénico de los erizos de las distintas zonas, en Cedeira y Reinante se hallan erizos en fases de premadurez, madurez y puesta en todos los meses del año, exceptuando uno o dos meses en los que la mayor parte de los individuos muestreados se encuentran en fase de recuperación e inicio de la gametogénesis; por el contrario, en las zonas de Fisterra y Aguiño la mayoría de los individuos muestreados se encuentran en fase de recuperación e inicio de la gametogénesis, especialmente en los meses de septiembre a enero donde son más del 50% de los erizos muestreados los que se encuentran en esta fase.

Los ovocitos y espermatozoos son depositados en el agua del mar por contracción de las capas musculares de las gónadas. La fecundación es externa y se produce en el medio marino, las hembras de *Paracentrotus lividus* alcanzan la madurez sexual a partir de los tres años de edad y los 2 cm de diámetro aproximadamente (Haya, 1990), pudiendo producir cada una entre 100.000 y 2.000.000 de ovocitos (Pallas & Pan, 2002). Los

ovocitos presentan un tamaño de entre 70 y 140 micras, alcanzando los valores más altos en primavera (Ojea *et al.*, 2008).

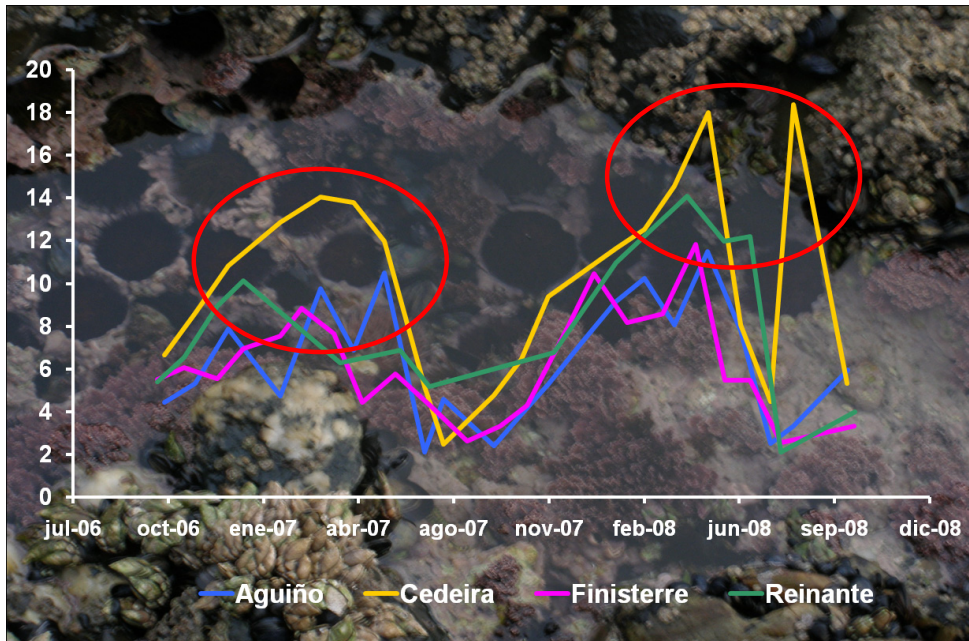


Figura 1-8.- Índice gonadal de *Paracentrotus lividus* en diferentes poblaciones gallegas. Tomado de: Ojea *et al.*, 2010.

1.1.5. Alimentación.

Los erizos de mar son animales omnívoros, se alimentan de todo tipo de materias orgánicas, animales o vegetales, vivas o muertas, aunque muestran preferencia por diferentes tipos de algas, considerándose de hecho como verdaderos herbívoros reguladores de la biomasa de las algas marinas (Niell & Pastor, 1973; Vadas, 1977; McClintock *et al.*, 1982; Scheibling & Stephenson, 1984; Palacín *et al.*, 1998; Pearse, 2006). Suelen alimentarse de noche, cuando los depredadores están ausentes. Tienen un poder de adaptación asombroso a las condiciones medioambientales. Cuando la comida es limitada, las actividades somáticas y reproductoras decrecen, desarrollándose al máximo el aparato digestivo para mejorar la asimilación del alimento (Fernández & Boudouresque, 1998).

1.1.6. Desarrollo.

Una vez que desovan los erizos de una determinada zona se produce una fecundación externa, este desove suele producirse de forma sincronizada, lo cual aumenta el porcentaje de fecundación (Pennington, 1985). A partir del ovocito fecundado la segmentación es igual hasta la etapa de ocho células. Aparece luego una blástula típica, seguida de una gástrula que adquiere forma cónica y que de manera gradual se convierte en una larva equinopluteus. Esta larva planctónica se alimenta en las aguas superficiales, donde las algas unicelulares son más abundantes, completando su desarrollo en un mes. Durante las etapas finales comienza a formarse el esqueleto adulto, migrando la larva hacia el fondo. La larva pluteus va desarrollando cuatro, seis y finalmente ocho brazos anclados en un incipiente esqueleto calcáreo; se forma después una invaginación de la pared llamada vestíbulo. Más tarde la larva es inducida a realizar la metamorfosis mediante señales químicas (Burke, 1983) y desciende buscando un sustrato donde llevarla a cabo (Fig. 1-9).

Durante la misma los tejidos larvarios se reabsorben y se forma una postlarva semejante a un individuo adulto diminuto, pero todavía carece de tracto digestivo y es por tanto endotrófica (Gosselin & Jangoux, 1998; Gago, 2009). La metamorfosis es sumamente rápida, dura aproximadamente una hora, después de la cual la postlarva da lugar a un individuo juvenil independiente y con un aparato digestivo totalmente desarrollado. La cría de erizo así formada suele tener de 0,5 a 1 milímetro de longitud (Gabín & Lorenzo, 1993).

El reclutamiento de los bancos de erizo suele tener grandes variaciones interanuales (Fenaux, 1986; Lozano *et al.*, 1995; Sala *et al.*, 1998), con episodios excepcionales, entremezclados con años de pobre reclutamiento. Existe una relación positiva entre las variaciones en la concentración de fitoplancton y la abundancia de larvas (Starr *et al.*, 1990), mientras que existe una relación negativa entre la abundancia larvaria y el reclutamiento, indicando fenómenos densodependientes en la mortalidad de los juveniles (López *et al.*, 1998).

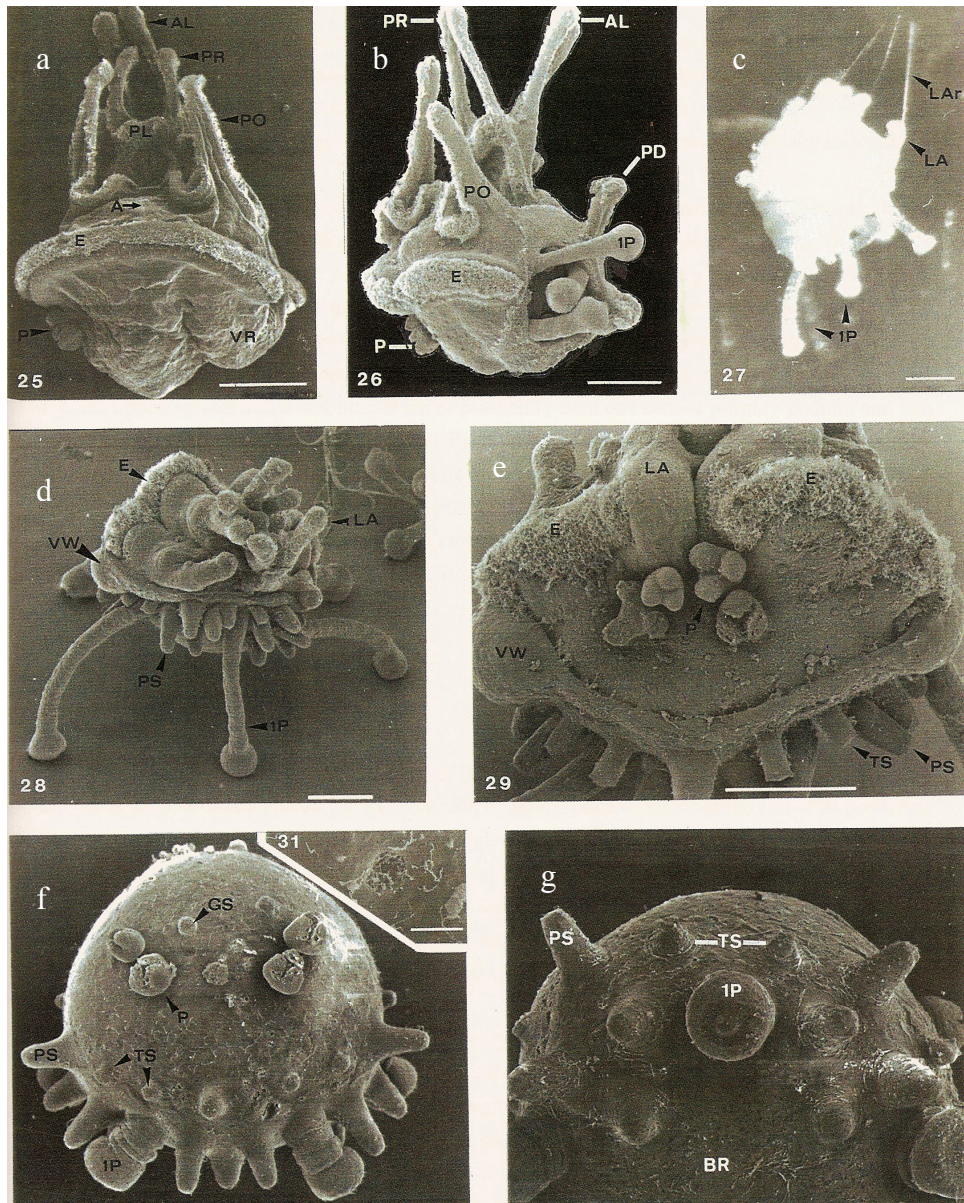


Figura 1-9.- Etapas de desarrollo de la larva de erizo de mar: larva equinopluteus (a, b, c), larva metamórfica (d, e) y postlarva (f, g). Tomado de: Gosselin & Jangoux (1998).

1.1.7. Importancia económica.

1.1.7.1. Producción y consumo.

Las primeras especies de equinodermos datan de hace aproximadamente 500 millones de años, si bien su consumo como alimento se inició en el Neolítico. Se han identificado aproximadamente unas 950 especies de erizos de mar, de las cuales *Paracentrotus lividus* es la más apreciada (Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2001), presentando

sus gónadas (Fig. 1-10) una creciente importancia comercial, pudiendo llegar en su etapa de madurez al 15% de su peso fresco; normalmente se consumen crudas, aunque existe una tendencia a elaborar con ellas productos como conservas, patés y congelados.



Figura 1-10.- Gónadas de *Paracentrotus lividus*. (Foto: J. L. Catoira).

En Galicia, además de *P. lividus*, existen otras especies como son *Echinus esculentus*, *Spharechinus granularis*, *Brissopsis lyrifera*, *Echinus alexandri* o *Psammechinus miliaris*, pero apenas poseen valor económico. Aunque en algunas zonas de Galicia los erizos de mar se capturan y consumen desde hace tiempo, la explotación comercial es muy reciente en nuestra comunidad autónoma y su consumo todavía no está generalizado. En Europa existen varias especies de erizos (Hansson, 2001), pero la especie más importante económicamente es *Paracentrotus lividus*, y se extrae principalmente en Francia (Allain, 1972; Ledireach *et al.*, 1987; LeGall, 1987), Irlanda (Byrne, 1990), España (Ballesteros y García-Rubies, 1987; Haya de la Sierra, 1990; Catoira, 1992), Portugal (Keesing y Hall, 1998), Italia (Gianguzza *et al.*, 2006; Pais *et al.*, 2007) y Grecia (LeDireach, 1987). La mayor parte de las extracciones de estos países tienen como destino final el mercado francés. Francia es el principal país

consumidor de erizos en Europa, siendo el segundo consumidor mundial después de Japón (Grosjean, 2001; Thorpe *et al.*, 2000). Los erizos de mar extraídos en Galicia son exportados a otras regiones españolas y a otros países como Francia, Alemania o Bélgica (González-Irusta, 2009).

La producción mundial de erizo rondaba las 117.000 toneladas anuales según una revisión realizada por Keesing & Hall en 1998, siendo los mayores productores Estados Unidos, Chile y Japón, mientras que Japón y Francia son los principales consumidores. En los años posteriores esta producción mundial de erizo fue disminuyendo progresivamente debido en gran parte a la reducción de las capturas de dos de los principales productores a nivel mundial, Chile y Estados Unidos. Según los últimos datos que podemos encontrar en la web www.fao.org en el año 2005 se produjeron 74.006 toneladas de erizo de mar en el mundo. El volumen de ventas en Galicia durante el año 2011 alcanzó los 656.995 kilogramos, con un precio medio de venta por kilo de 2,85 €. Es necesario recordar que el desastre del petrolero Prestige ocurrió en el año 2002, este accidente repercutió de forma notable en las capturas de erizo del año 2003 que se redujeron a menos de la mitad (Tabla 1-2 y Fig. 1-11).

Tabla 1-2.-: Evolución de la captura de *Paracentrotus lividus* en Galicia. Elaboración propia a partir de datos de la Consellería do Medio Rural e do Mar.

FECHA	KILOS	IMPORTE €	MÍNIMO €/Kg.	MÁXIMO €/Kg.	MEDIA €/Kg.
1998	548.838				
1999	615.534				
2000	491.549				
2001	576.426	868.367,93	0,60	4,15	1,51
2002	615.760	983.791,65	0,10	4,68	1,60
2003	300.761	495.357,24	0,50	3,50	1,65
2004	758.039	1.241.987,74	0,50	6,15	1,64
2005	764.888	1.250.501,26	0,06	5,00	1,63
2006	737.808	1.469.808,19	0,50	6,25	1,99
2007	701.782	1.698.606,78	0,10	6,50	2,42
2008	747.948	1.987.498,35	0,10	9,00	2,66
2009	432.516	1.214.793,06	0,15	6,75	2,81
2010	629.901	1.793.012,73	0,20	8,00	2,85
2011	656.995	1.875.572,55	0,35	7,10	2,85

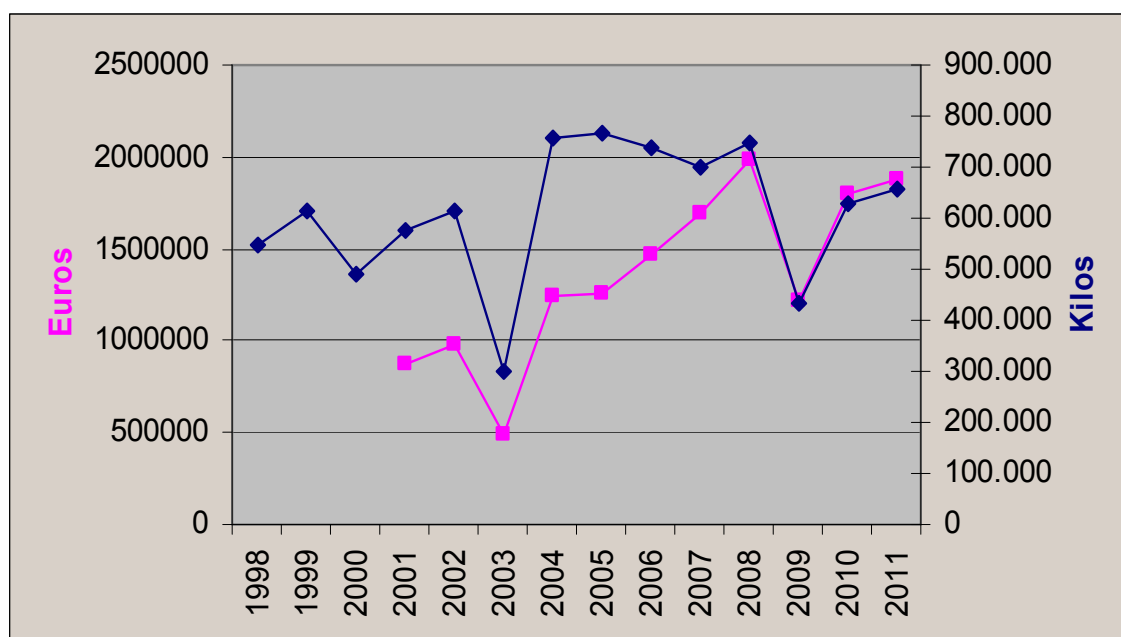


Figura 1-11.- Gráfico representativo de la producción y del valor de *Paracentrotus lividus* en Galicia. Elaboración propia a partir de datos de la Consellería do Medio Rural e do Mar.

Las extracciones de erizo han ido decayendo progresivamente año a año a nivel mundial, principalmente se redujeron las capturas en dos de los grandes países productores, Chile y Estados Unidos (González-Irusta, 2009), lo cual hace cada vez más necesaria una investigación dirigida a desarrollar estrategias de cultivo (Kawamura, 1984; Workman, 1999). En Galicia sin embargo se mantienen las capturas de erizo en cifras razonablemente constantes. Se apreció una caída de la extracción de erizo en el año 2009 (432.516 kilos), que pudo ser debida a un descenso de las poblaciones naturales, lo que dificulta su captura; además ésta es una especie de lenta recuperación y crecimiento (Girard *et al.*, 2006). En el año 2011 las cifras de extracción vuelven a niveles cercanos a los de años anteriores al 2009, con una producción de 656.995 kilogramos (Fig. 1-11).

En Galicia, la extracción de erizos está permitida desde noviembre a abril, con veda desde mayo a octubre. Para el año 2012 se aprobaron por parte de la Consellería do Medio Rural e do Mar un total de 214 planes de explotación, 19 para la extracción del erizo:

- Provincia de A Coruña

- C.P. A Coruña y Barallobre.
- C.P. Aguiño y Ribeira.
- C.P. Cedeira, Cariño y O Barqueiro-Ares.
- C.P. Espasante.
- C.P. Ferrol.
- C.P. Lira, Fisterra y Corcubión.
- C.P. Malpica, Corme, Laxe, Camelle, Camariñas y Muxía.
- C.P. Porto do Son, Portosín y Muros.

- Provincia de Lugo

- C.P. Celeiro.
- C.P. O Vicedo, San Cibrao y Celeiro.
- C.P. San Cibrao, Burela, Ribadeo y AM San Cosme-Foz.

- Provincia de Pontevedra

- C.P. A Guarda (a pié).
- C.P. A Guarda (buceo).
- C.P. Aldán.
- C.P. Baiona.
- C.P. Bueu, Portonovo y Sanxenxo.
- C.P. Cangas.
- C.P. O Grove.
- C.P. Vigo.

El aumento constante de la demanda de erizos de mar para cubrir las necesidades del mercado de países como Francia, Italia, Turquía, Bélgica o Japón, donde las gónadas de erizo de mar son consideradas una exquisitez culinaria, está provocando una disminución del recurso en las diferentes pesquerías que se extienden por todo el mundo (Keesing & Hall, 1998; Andrew *et al.*, 2002; Catoira, 2004) debido a la sobreexplotación a la que está siendo sometido. El mercado más importante a nivel mundial es el japonés, que constituye aproximadamente un 95% del total entre producción e importaciones de erizos; en segundo lugar se encuentra Francia, cuya

producción nacional es bastante limitada y se ve obligada a importar erizos de otros países como Grecia, Irlanda o España. Los bajos niveles de captura unidos al aumento de la demanda dan como resultado un incremento del precio del kilogramo de gónada de erizo, que oscila entre los 200 y los 400 dólares en países como Japón, dependiendo de la época del año y de la especie de erizo que se comercialice (Pearce *et al.* 2002).

Es evidente la necesidad de desarrollar una acuicultura orientada al cultivo de erizo de mar, que en un futuro no muy lejano verá excesivamente mermadas sus poblaciones naturales; por otra parte, la recolección de individuos adultos del medio natural deja indefensos ante los depredadores a los juveniles que se protegían bajo las púas de los adultos. Esta circunstancia hace necesario el desarrollo progresivo del cultivo de las especies comerciales para cubrir la demanda del mercado, así como el desarrollo de técnicas de cultivo que, empleando nuevas tecnologías, permitan mejorar las características organolépticas de las gónadas obtenidas del medio salvaje, con el objetivo de que alcancen un precio en el mercado que haga rentable la producción a nivel industrial de las mismas. Debido a que la producción natural del erizo en Galicia es insuficiente para el abastecimiento del mercado, la Consellería do Medio Rural e do Mar está impulsando la regulación de la extracción mediante la utilización de planes de explotación de recursos específicos. Además de esta medida de regulación, sería interesante recuperar el estado de sobreexplotación de los bancos de *Paracentrotus lividus* en el litoral gallego mediante la obtención de individuos juveniles que permitan llevar a cabo una repoblación de los mismos, siendo éste uno de los objetivos principales de nuestro estudio.

1.1.7.2. Gastronomía e información nutricional.

Hasta hace poco la única comunidad donde se consumían erizos de mar (oricios) en la costa cantábrica era Asturias y hoy en día sigue siendo la comunidad española donde más se consumen con diferencia. El caviar de oricios se elabora de forma artesanal, extrayendo las gónadas manualmente y envasándolas. Esta conserva empezó a elaborarse en 1930 en dos localidades francesas de ultramar: Saint Pierre y Miquelón. Otras comunidades donde se consumen erizos son Cataluña y Andalucía, y en Galicia es un hábito que se está incrementando cada vez más; el erizo del Mediterráneo es más insípido debido a las características del agua, aunque en la antigua Grecia ya existía una

gran tradición de consumo de este marisco. En el Neolítico ya se consumían erizos crudos o bien asados en su propio caparazón; en la época romana también se comían “inpreparatos”, es decir, crudos, o conservados en sal. Se han encontrado mosaicos de la época que representan banquetes donde se puede apreciar el consumo de erizos crudos o sazonados con vinagre y perejil o menta picada. Apicio Marco Gavio escribió uno de los libros de recetas más conocidos de la antigüedad, “*De re coquinaria libri decem*”, en el año 25 a.C., en el cual se sazonan los erizos con mosto cocido y pimienta (www.diarioinformacion.com). Aunque se comen principalmente en crudo, en la actualidad se preparan infinidad de recetas usando las gónadas de *Paracentrotus lividus* como ingrediente, por ejemplo: jugo de cordero con oricios, naranja y regaliz; erizos gratinados al perfume de cava...etc. En la figura 1-12 se presentan algunas de ellas.



Figura 1-12.-: a) lasaña de oricio, b) merluza con crema de oricios, c) caramelos de oricio.

Julio Camba, en su famoso libro “La casa de Lúculo o el arte de comer”, dedica al erizo de mar este significativo párrafo: “después de tomarse quince o veinte docenas -porque el tomar este marisco no es comer ni beber, sino respirar en pleno océano- la más fina langosta le sabrá a galápago. No hay marisco alguno que sintetice el mar de un modo tan perfecto como el erizo”. Sus glándulas genitales presentan un color amarillado anaranjado en las hembras y son un poco más blanquecinas en los machos. Para degustarlos en su estado más puro la mejor forma de hacerlo es consumirlos en crudo ayudándose de una cucharilla. Se pueden preparar con pescados o mezclar su contenido con salsas para pescado intensificando así su sabor de forma espectacular. Se utilizan en la elaboración de pudines o pasteles de pescado y marisco, también es común prepararlos en revueltos o gratinados. El paté de oricios es una de las conservas más apreciadas, en su mayoría se elabora en Asturias.

Además de ingrediente gastronómico, antiguamente se usaban los erizos también como medicamento, en Italia se utilizó durante varios siglos el caparazón del erizo como remedio para curar enfermedades cutáneas; una vez seco, se majaba con aceite de oliva y se aplicaba en forma de unguento sobre la piel. Basilio de Cesarea, doctor de la iglesia católica en el siglo IV, recogió en sus escritos una serie de creencias que existían en torno al erizo: “He sabido que el erizo de mar es un remedio eficaz para el estómago, es una ayuda para los que sufren de inapetencia, es diurético. También, si lo extendemos sobre el cuerpo de un enfermo de sarna, el erizo lo cura de la enfermedad”. Existe abundante literatura sobre esta especie, a la que se refirió Ramón Gómez de la Serna diciendo que era “una castaña a la que se le han erizado los pelos”.

Como podemos ver en la tabla 1-3, las gónadas de erizo (en este caso de *Loxechinus albus*) son un alimento muy bajo en calorías, contienen pocos hidratos de carbono pero son ricas en proteínas y grasas poliinsaturadas, además contienen mucho hierro y fósforo.

Tabla 1-3.- Valor nutricional de la gónada. Tomado de www.prochile.cl.

Energía (Kcal).....	85	Grasa total (mg).....	4,2
Proteínas (g).....	7,8	AGS (mg).....	1,5
Hid. de carbono (g).....	4,1	Hierro (mg).....	4,5
Fibra dietética (g).....	1,2	Sodio (mg).....	727

1.1.7.3. Cultivo.

Actualmente gran parte de los esfuerzos realizados en este sentido van dirigidos por un lado a la acuicultura del ciclo reproductivo completo del erizo, desde la inducción del desove hasta la obtención de individuos juveniles, con vistas a posteriores repoblaciones; por otra parte, también se lleva a cabo un engorde de juveniles obtenidos del medio en instalaciones de tierra, alimentándolos con diferentes tipos de dietas, tanto naturales como diseñadas específicamente.

Existen gran cantidad de estudios realizados dirigidos a diseñar distintos sistemas de cultivo de erizos de mar, aquí citamos sólo algunos ejemplos: Hinegardner, 1969 (cultivo en laboratorio); Jangoux *et al.*, 1996; Hagen, 1996; Basuyaux *et al.*, 1998 (describe un sistema de cultivo en tierra basado en un circuito cerrado con recirculación del agua); Schulze *et al.*, 2006; James, 2006b (compara las ventajas y desventajas de la utilización de cajas de cultivo situadas en el medio marino o en tierra). A continuación se citan algunos de los trabajos realizados basados en estudios nutricionales y en el diseño de dietas experimentales para la alimentación de los erizos en estructuras de cultivo: Bückle *et al.*, 1977; Basuyaux *et al.*, 1998; Fernández & Pergent, 1998; Fernández & Boudouresque, 2000; Lawrence *et al.*, 2003 (con el erizo *Lytechinus variegatus*); Senaratna *et al.*, 2005 (con el erizo *Heliocidaris erythrogramma*); Schlosser *et al.*, 2005 y Shpigel *et al.*, 2005; este último se basa en el diseño de una dieta dirigida a obtener mejoras organolépticas (en este caso del color) en las gónadas de *Paracentrotus lividus* de cultivo alimentados con ella.

La mayoría de los estudios orientados hacia la generación de tecnologías que permitan el cultivo del erizo de mar enfatizan la importancia del cultivo larvario (Cellario & Fenaux, 1990), los sistemas de cultivo, el incremento de la calidad de la gónada y el desarrollo de dietas experimentales; existe además una tendencia creciente al desarrollo de sistemas de cultivo en el medio marino de esta especie. El sistema de engorde en batea presenta la ventaja de tener un coste de mantenimiento e infraestructuras considerablemente más bajo que los sistemas terrestres de cultivo, lo cual permite obtener mayor rentabilidad del producto final en el mercado; la desventaja del cultivo en el medio marino está relacionada con el menor control que se puede ejercer sobre las condiciones ambientales tales como corrientes marinas o tormentas, en relación con el cultivo en circuito cerrado (James, 2006a), por otra parte es más dificultoso el acceso a las estructuras de cultivo pese a lo cual actualmente la mayoría de los estudios realizados en relación al engorde de erizos de mar se llevan a cabo en el medio marino.

Los sistemas de cultivo basados en tanques con circuito cerrado de agua (ver figuras 1-13 y 1-14) poseen la ventaja de una mayor capacidad de control sobre todas las condiciones ambientales que rodean a los erizos (Fridberger *et al.*, 1979), temperatura del agua, concentración de oxígeno, salinidad, fotoperiodo, etc., así como una mayor facilidad de acceso a los individuos para su alimentación y limpieza; su principal

desventaja es económica, ya que las infraestructuras necesarias para un buen mantenimiento del cultivo de circuito cerrado conllevan un coste económico considerable que puede revertir en que el cultivo no sea rentable.



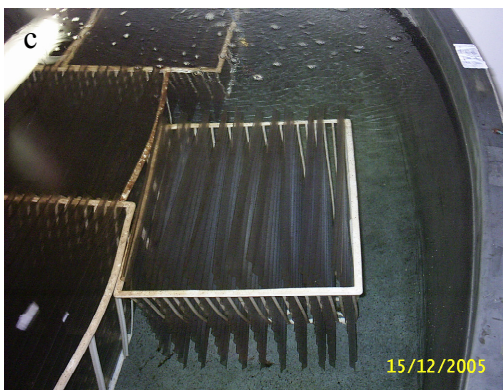
Figuras 1-13 a y b.- Dos tipos diferentes de estructuras terrestres de cultivo de erizo de mar en Chile. (Foto: M. Rey).



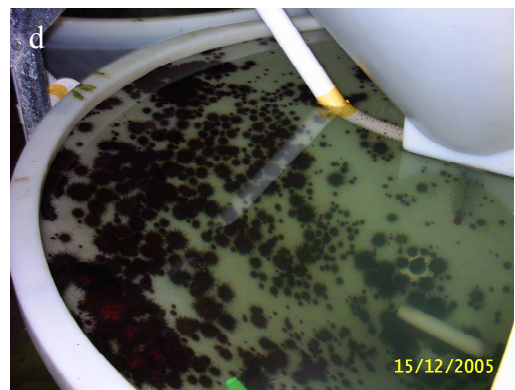
Distintas fases del crecimiento en cultivo



Fase de cultivo larvario del erizo



Fase de pre-engorde en tanques



Fase de engorde en tanques tipo embudo



Engorde en tanques en invernadero



Jaula para engorde en el medio natural

Figuras 1-14 a-d.- Distintas fases del cultivo y engorde de *Paracentrotus lividus* en Bantry (Irlanda). Fotos: J. L. Catoira.

En Nueva Zelanda se realizó un estudio comparativo del cultivo del erizo, tanto en infraestructuras terrestres como en cajas de cultivo de langosta suspendidas en el medio

marino, dando como resultado una mayor viabilidad económica de este último debido a la importante reducción de los gastos a nivel de infraestructuras (Jeffs & Hooker, 2000).

Existe una tendencia cada vez mayor orientada al desarrollo de cultivos multitróficos en los que se estabulan varias especies de niveles tróficos diferentes al mismo tiempo, es decir, los residuos alimenticios de una de las especies cultivadas sirven de alimento a una segunda especie, de esta forma se consigue integrar el crecimiento de dos o más especies de alto valor económico con un gasto en infraestructuras relativamente reducido.

Un ejemplo de este tipo de cultivo multitrófico lo encontramos en el trabajo realizado por Cook & Kelly en el año 2007, en él se investigaron la supervivencia y la integración de *Paracentrotus lividus* en un cultivo marino de salmón (*Salmo salar*) situado en la costa noroeste de Escocia. Se demostró que los grupos de erizos que crecían al lado de la estación donde se cultivaba el salmón asimilaban gran cantidad de partículas de materia orgánica procedente de este cultivo, lo cual mejoraba tanto su supervivencia como su crecimiento y las cualidades organolépticas de sus gónadas; además el crecimiento gonadal mejoraba al añadir macroalgas del género *Laminaria* spp. Este experimento concluye que el cultivo integrado del erizo de mar con el Salmón permitiría obtener un segundo producto de alto valor en el mercado y reducir asimismo la presión sobre los bancos naturales de erizo.

Este tipo de cultivo multitrófico lo realiza actualmente la empresa Loch Duart Ltd. (Scourie, Escocia), (Fig. 1-15), mientras que en España, la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) financió un proyecto (en el que participaron las CC.AA. de Andalucía, Baleares, Canarias, Cataluña, Galicia y Murcia), titulado “Acuicultura integrada: experiencia piloto para el cultivo de sistemas de cultivo multitróficos” entre los años 2008 y 2011, con el objetivo, entre otros, de evaluar la efectividad de los sistemas multitróficos en la acuicultura española, siendo el erizo de mar una de las especies utilizadas por varios de los grupos integrantes del proyecto. En las conclusiones de dicho proyecto está el dejar un marco regulatorio adecuado que fomente y permita el desarrollo de la acuicultura multitrófica integrada (AMTI) en España, con una base normativa igual en todas las regiones, aunque cada CC.AA. elabore las normas que crea necesarias posteriormente.



Figuras 1-15 a-d.- Distintas fases del cultivo multitrófico en Escocia. Fotos: M. Rey.

La empresa Loch Duart Ltd., produce salmón bajo pautas de buenas prácticas medioambientales, para ello, entre otras acciones produce piensos de forma sostenible, elimina el empleo de antifoulings y tratamientos preventivos, e impulsa el desarrollo local dando trabajo a gran parte de la población de la zona y todo ello con el desarrollo de métodos de producción que aseguren el bienestar de los peces. Obtienen una producción de características diferenciadoras, en cuanto a calidad, peso medio de los ejemplares y vías de comercialización.

1.1.7.4. Diseño de dietas experimentales.

El objetivo del desarrollo de la acuicultura del erizo de mar a nivel industrial es tener la capacidad de abastecer la demanda de gónadas de erizo en países como Japón, Canadá o Estados Unidos, que en un futuro no muy lejano no podrán cubrir con los bancos naturales. Para realizar con éxito un cultivo de erizo de mar consiguiendo además resultados óptimos a nivel tanto de crecimiento somático como de incremento del índice gonadal, es necesario elaborar diferentes tipos de dietas que nos permitan realizar un

estudio comparativo con el fin de obtener un patrón alimenticio que nos asegure una producción óptima. En este sentido se han llevado a cabo numerosos trabajos desarrollando dietas que cubren las necesidades energéticas de los erizos de mar (Klinger *et al.*, 1998), que promueven su crecimiento somático (McCarron *et al.*, 2009) y mejoran además las características de las gónadas de numerosas especies de erizos: *Paracentrotus lividus* (Lawrence *et al.*, 1989, 1992; Fernández & Caltagirone, 1994; Fernández *et al.*, 1995; Fernández & Pergent, 1998; Fernández & Bouderesque, 2000; Spirlet *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2007), *Lytechinus variegatus* (Lowe & Lawrence, 1976; Klinger *et al.*, 1986, 1994; Hammer *et al.*, 2004, 2006), *Evechinus chloroticus* (Barker *et al.*, 1998; Woods *et al.*, 2008), *Loxechinus albus* (Lawrence *et al.*, 1997; Olave *et al.*, 2001), *Psammechinus miliaris* (Cook *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998; Pantazis *et al.*, 2000; McLaughlin & Kelly, 2001; Cook *et al.*, 2007), *Strongylocentrotus droebachiensis* (De Jong-Westman *et al.*, 1995; Pearce *et al.*, 2002), *Strongylocentrotus pulcherrimus* (Nagai & Kaneko, 1975) y por último *Strongylocentrotus franciscanus* (McBride *et al.*, 1998, 1999). Sin embargo, todavía no se han identificado los componentes alimenticios específicos que son responsables del crecimiento gonadal o de su desarrollo óptimo a nivel organoléptico (Senaratna *et al.*, 2005).

La composición de la dieta que les será suministrada afecta de forma determinante a la composición bioquímica de los erizos, como demuestran numerosos estudios en los que se han comparado stocks recogidos del medio natural con otros procedentes de tanques de cultivo y alimentados con dietas elaboradas (Fernández, 1990; Fernández & Caltagirone, 1994; McBride *et al.*, 2004). El uso de dietas elaboradas con un elevado porcentaje de proteínas, en comparación con el alimento natural de los erizos, favorece la acumulación de sustancias de reserva en las gónadas en forma de lípidos y carbohidratos, lo cual repercutirá en un mayor crecimiento de las mismas (Fernandez, 1995, 1997; Liyana-Pathirana *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2007). Los pigmentos como la equininona o los carotenos son también fundamentales para obtener una buena coloración gonadal en los erizos cultivados (Pantazis, 2006; Symonds *et al.*, 2007).

En la elaboración de las dietas que serán suministradas a los erizos es necesario considerar varios factores, por una parte es de vital importancia la estabilidad de los pellets en el agua, es decir, su capacidad para mantener la textura inicial y la insolubilidad de sus ingredientes, permaneciendo íntegros durante el mayor tiempo

posible; además deben contar con una buena aceptación por parte de los erizos (Dworjanyn *et al.*, 2007). Durante el proceso de elaboración de estas dietas es necesario tener en cuenta además las proporciones y composición bioquímica de proteínas, lípidos e hidratos de carbono con el fin de que posteriormente repercutan tanto en el crecimiento y mejora de las gónadas (Christiansen & Siikavuopio, 2007) como en la formación del exoesqueleto. Existen varios estudios que demuestran la importancia de la proteína en la dieta, sobre todo durante las primeras etapas del desarrollo (Lawrence & Lane, 1982; De Jong-Westman *et al.*, 1995; Fernández, 1997; Kelly *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1998; Mc Bride *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2002; Arce & Luna-Figueroa, 2003). Se cree que este elevado porcentaje de proteína en los primeros estadios del desarrollo es necesaria para la formación del exoesqueleto o bien sería requerida para la formación de una matriz intraestrómicamente en la cara interna del mismo (Dubois & Chen, 1989).

1.2. Crecimiento de *Paracentrotus lividus*.

1.2.1. Desarrollo y crecimiento.

Una de las características principales de los seres vivos es que éstos crecen. Los seres vivos requieren de nutrientes para poder realizar sus procesos metabólicos que los mantienen vivos y, al aumentar el volumen de materia viva, el organismo logra su crecimiento. El desarrollo se diferencia del crecimiento en que se define como la adquisición de nuevas características, la maduración de ciertas partes del organismo, independientemente del aumento de tamaño del individuo. En esta memoria nos centraremos en el desarrollo de los órganos reproductores o gónadas de *Paracentrotus lividus*, por tratarse de la parte comestible del erizo y por lo tanto del órgano de interés comercial del mismo.

Se entiende como crecimiento al aumento irreversible de tamaño en un organismo, como consecuencia de la proliferación celular, que conduce a su vez al desarrollo de estructuras más especializadas del mismo, comenzando por las propias células y, pasando por tejidos, hasta llegar a órganos y sistemas.

El crecimiento también se define como el aumento en el número de células de un organismo, lo que conlleva al aumento de tamaño. Es medible y cuantificable. El crecimiento se consigue por una doble acción: un aumento en el tamaño de las células del cuerpo, y un aumento en su número total. El crecimiento es, en definitiva, el proceso mediante el cual los seres vivos aumentan su tamaño y gracias al cual se desarrollan hasta alcanzar la forma y la fisiología propias de su estado de madurez.

Tanto el crecimiento como la división celular dependen de la capacidad del organismo para asimilar los nutrientes que encuentra en el ambiente en que se desarrolla. Así, los alimentos son usados por el cuerpo para construir nuevas estructuras celulares, de ahí la importancia del diseño de dietas experimentales adecuadas y orientadas a optimizar el crecimiento de los erizos cultivados en la batea, así como a incrementar el tamaño de sus gónadas en el menor periodo de tiempo posible.

El crecimiento en equinoideos se basa en el cambio de masa, de diámetro y de forma que requiere la extensión, la calcificación, y la producción de tejidos blandos. El aumento de tamaño esquelético está basado en los procesos celulares que causan tanto cambios de forma durante el crecimiento, como el incremento del diámetro de los erizos. El aumento de tamaño del caparazón se produce mediante la calcificación de las placas esqueléticas y la adición de nuevas placas ambulacrales e interambulacrales. Estas placas están formadas por osículos compuestos fundamentalmente por calcio y magnesio, cuyo proceso de calcificación se lleva a cabo en una matriz orgánica específica.

Existen varios trabajos que analizan el crecimiento de *Paracentrotus lividus*, tanto en el medio natural (Fenaux *et al.*, 1987; Azzolina, 1988; Haya de la Sierra, 1990, Turon *et al.*, 1995); como llevando a cabo experimentos de cultivo (Fernandez *et al.*, 1995; Grosjean *et al.*, 1996; Spirlet *et al.*, 2000; Grosjean *et al.*, 2003; Shpigel *et al.*, 2004).

En la costa gallega se ha establecido la relación entre el tamaño y la edad de los individuos de *Paracentrotus lividus*, resultando que la talla comercial, establecida en 55 mm de diámetro del caparazón, se alcanza entre los 8 y 9 años desde su nacimiento (Catoira, 1999).

1.2.2. Tipos de crecimiento.

El crecimiento puede definirse como el desarrollo progresivo del cuerpo, especialmente en altura, que tiene lugar en los primeros años de la vida de un individuo.

El crecimiento de los organismos se produce, en general, por medio de diferentes procesos, entre los que están:

- El aumento en el número de células del cuerpo.
- Por la adición de nuevas estructuras al organismo.
- Por renovación del tejido que recubre el cuerpo, como el cambio o muda de piel en las víboras, el de plumaje en las aves o el de pelo en los mamíferos.
- Por modificación de estructuras ya existentes (por ejemplo, el crecimiento del cuerno en un rinoceronte o las astas de un venado).

Existen varios tipos de crecimiento que describimos a continuación:

- **Crecimiento isométrico:** aumento del tamaño de diferentes órganos o partes de un organismo a la misma velocidad. Lo presentan los organismos cuyas proporciones corporales se mantienen iguales y en ellos se cumple que:

$$w = a \cdot l^3$$

donde :

w = es el peso corporal

l = longitud corporal

a = constante

Además se cumple que: $s = a \cdot l^2$

donde:

s = superficie corporal

- **Crecimiento alométrico:** aumento de tamaño a diversas velocidades de diferentes órganos o de diferentes partes de un organismo. Un organismo presenta crecimiento alométrico si las proporciones corporales cambian durante su vida. En este caso el peso no es el cubo de la longitud sino:

$$w = a \cdot l^b$$

$$s = a \cdot l^c$$

donde:

b= un valor diferente de 3.

c= un valor diferente de 2.

- **Crecimiento absoluto:** aumento total del tamaño de un organismo o de algún órgano o parte del mismo, como pueden ser las extremidades, la cabeza o el tronco.
- **Crecimiento acrecional:** aumento de tamaño resultante de un incremento del número de células especiales por división mitótica, mientras que otras células más diferenciadas, que realizan diversas funciones fisiológicas, han perdido su capacidad para proliferar.
- **Crecimiento auxético:** el que resulta del aumento de volumen producido por un crecimiento de las células individuales pero no de su número.
- **Crecimiento compensador:** aceleración de la tasa de crecimiento tras un período de retraso del mismo provocado por un déficit secundario, como la malnutrición aguda o una enfermedad severa.
- **Crecimiento diferencial:** comparación del aumento de tamaño de partes u órganos disimilares.
- **Crecimiento exponencial:** crecimiento en el que el número de células se duplica cada vez que éstas se dividen, de manera que una única célula pasa a 2, 4, 8, 16, 32, 64... células. Este tipo de crecimiento es típico de los cultivos bacterianos.
- **Crecimiento histiotípico:** proliferación celular incontrolada, como ocurre en los cultivos de bacterias y hongos.
- **Crecimiento intersticial:** aumento de tamaño por hiperplasia o hipertrofia en el interior de una zona o estructura ya formada.
- **Crecimiento multiplicativo:** aumento de tamaño como consecuencia de la división celular y de la adición de material nuevo más que de la expansión de la célula.

- **Crecimiento organotípico:** reproducción controlada de las células, como ocurre en el crecimiento normal de los tejidos y órganos.
- **Crecimiento por aposición:** aumento de tamaño que se produce por la adición de un tejido nuevo o de un material similar en la periferia de una determinada parte o estructura, como cuando se incorporan capas nuevas a las ya existentes en la formación de los huesos o de los dientes.
- **Crecimiento relativo:** comparación entre los diferentes aumentos de tamaño de organismos, tejidos o estructuras similares, durante diferentes intervalos de tiempo.

1.2.3. Modelos de crecimiento y métodos de estudio.

Existen dos tipos principales de modelos de crecimiento según su objetivo (Grosjean, 2001), por un lado los que explican el crecimiento de una especie a nivel poblacional (modelo logístico y modelo de Gompertz) y por otro los modelos que describen el crecimiento de cada individuo dentro de una población (curva de Von Bertalanffy). Aunque se han desarrollado numerosos modelos de crecimiento en este trabajo se describen algunos de los más destacados y empleados en la bibliografía consultada:

1.2.3.1. Modelo de crecimiento exponencial o ecuación malthusiana (Malthus, 1798).

Este modelo se basa en una población hipotética cuyos individuos poseen la capacidad de autoduplicarse por unidad de tiempo, donde no existe la mortalidad y cuyos recursos son ilimitados. El modelo exponencial no tiene en cuenta ningún tipo de interacción con otras especies, representa el crecimiento de la población en una fuente de presión constante que puede abastecer tanta energía como se necesita. La curva de crecimiento de una población bajo estas condiciones se denomina crecimiento exponencial y aumenta constantemente en función del tiempo. La ecuación que representa este modelo es la siguiente:

$$N_t = N_0 e^{bt}$$

donde:

N_t = número total de individuos.

N_0 = número inicial de individuos.

b = tasa de crecimiento per cápita en función del tiempo.

t = tiempo transcurrido.

Cuando la tasa de crecimiento es >1 , la población crece exponencialmente; si la tasa de crecimiento es $= 1$ el tamaño de la población permanece constante y si es < 1 la población se reducirá progresivamente hasta la extinción.

1.2.3.2. Modelo logístico o dependiente de la densidad (Verhulst, 1838).

Es una variación del modelo exponencial que introduce el factor de los recursos limitados y las interacciones entre los individuos de la población, es decir, tiene en cuenta que a mayor densidad de población antes se agotarán los recursos alimenticios y espaciales de la misma. Por la misma razón una población pequeña tendrá mayor cantidad de recursos disponibles y por lo tanto crecerá a mayor velocidad. El crecimiento logístico viene dado por un balance entre reproducción y mortalidad de los individuos debido a una reducción de los recursos disponibles, el crecimiento de la población según este modelo está representado por una curva sigmoidea con un límite superior K que representa la máxima densidad de población que puede sostener el medio. El modelo logístico está representado por la ecuación:

$$L_{(T)} = L_{\infty} / (1 + e^{-k(T-T_0)})$$

donde:

$L_{(T)}$ = longitud en función de la edad.

L_{∞} = longitud máxima.

k = constante de crecimiento.

T = tiempo final.

T_0 = tiempo inicial.

1.2.3.3. Modelo de Gompertz (Gompertz, 1825).

Este es uno de los modelos más utilizados para medir el crecimiento poblacional, su representación es una curva sigmoideal en la cual al principio del periodo de tiempo el crecimiento se incrementa lentamente hasta alcanzar un punto álgido, después del cual vuelve a ralentizarse de forma mucho más acusada que al inicio de la función. La diferencia con la curva sigmoideal del modelo logístico estriba en que en este modelo se produce un máximo de crecimiento en el centro de la función, acotado por dos asíntotas de crecimiento mucho menor pero dispuestas simétricamente a ambos lados de la curva. La función matemática de Gompertz es:

$$L_{(T)} = L_{\infty} e^{-be^{-kt}}$$

donde:

$b = \ln (L_{\infty} / L_0)$, y L_{∞} es la asíntota superior de la función.

$L_{(T)}$ = longitud en función de la edad.

L_{∞} = longitud máxima.

k = constante de crecimiento.

t = tiempo.

1.2.3.4. Modelo de Brody-Bertalanffy o de Von Bertalanffy (Von Bertalanffy, 1938; Brody, 1945).

Este es el modelo más utilizado en la bibliografía para medir el crecimiento de equinodermos en general y de *Paracentrotus lividus* en concreto, es un modelo de crecimiento individual y además nos permite hacer comparaciones extensas entre el crecimiento de los individuos de una especie, aunque no puede describir crecimientos que presenten puntos de inflexión (Lawrence, 1975). La ecuación que lo describe es:

$$L_{(T)} = L_{\infty} (1 - be^{-kt})$$

donde:

$$b = e^{kt},$$

o bien:

$$L_{(T)} = L_{\infty} (1 - e^{-k(T - T_0)})$$

1.2.3.5. Modelo de Richards (Richards, 1959).

La función de Richards es un modelo de crecimiento formado por una serie de curvas que incluye a los modelos logístico, de Gompertz y de Von Bertalanffy, que por otro lado son los más utilizados en el estudio del crecimiento en equinodermos. La fórmula de la función de Richards es la siguiente:

$$L_{(T)} = L_{\infty} (1 - e^{-k(T - T_0)})^m$$

donde:

m = exponente que define la forma de la curva.

Cuando $m = -1$ esta ecuación es equivalente a la expresión del modelo de Von Bertalanffy, si $m = 1$ la función representa el modelo logístico y si el valor absoluto de m tiende al infinito entonces la ecuación se equipara al modelo de Gompertz (Ebert, 1999).

Además de los modelos de crecimiento descritos existen otros, la mayor parte son variaciones de los modelos anteriores como los de Jolicoeur (1985) o Tanaka (1988); es necesario señalar que no existe un criterio establecido a la hora de escoger un modelo de crecimiento en lugar de otro, la elección del modelo de crecimiento más adecuado al estudio que se está realizando es una decisión derivada de una valoración subjetiva, aunque los modelos descritos se adecúan perfectamente a la evaluación de los recursos pesqueros (FAO, 2003).

1.2.4. Factores que regulan el crecimiento.

Los factores determinantes del crecimiento de los seres vivos son fundamentalmente de dos tipos: nutricionales y genéticos; también ejercen una influencia notable en la tasa de crecimiento de los seres vivos en general, y especialmente en el caso de *Paracentrotus lividus*, factores ambientales como la temperatura, el fotoperiodo, etc.

Los factores nutricionales son imprescindibles ya que los seres vivos necesitan una adecuada disponibilidad de alimentos, así como la capacidad de utilizarlos por el propio organismo, con el fin de asegurar tanto su supervivencia como su crecimiento.

Los factores genéticos ejercen su influencia sobre el crecimiento del individuo durante todo el proceso mediante la expresión de las variaciones específicas que vienen dadas por la información de los genes, cada especie presenta diferentes pautas de crecimiento; además dentro de una misma especie se pueden apreciar diferencias en los procesos de maduración entre los individuos de distinto sexo, e incluso entre los del mismo sexo, que están determinadas por la información genética de cada individuo.

Existen además factores internos, como las hormonas, que afectan a la célula acelerando o inhibiendo la división celular y regulando así el crecimiento de la misma.

1.3. Genética molecular y ecología.

1.3.1. Genética molecular.

La genética clásica es la parte de la biología que estudia la herencia biológica, intentando explicar los mecanismos que rigen la transmisión de los caracteres de generación en generación. La genética molecular estudia los procesos desde un punto de vista químico, analizando la estructura y la función de los ácidos nucleicos.

La ecología molecular es un área pluridisciplinar de la ecología que se basa en el uso de marcadores moleculares de ADN como caracteres genéticos, con el objetivo de resolver los problemas clásicos de la ecología de poblaciones.

1.3.2. ¿Qué es un marcador molecular?

Un marcador molecular es una biomolécula que se puede relacionar con un rasgo genético; los marcadores moleculares corresponden a un gen que al expresarse produce una característica fenotípica fácil de detectar o cuantificar. Un marcador molecular es además genético cuando se transmite siguiendo las leyes de la herencia mendeliana.

El marcador molecular puede ser monomórfico si presenta la misma estructura en todos los organismos estudiados, si por el contrario tiene diferentes formas de expresión en relación a su peso molecular, actividad enzimática, etc., se dice que el marcador es polimórfico; cuando este nivel de variación es muy elevado se denomina marcador hipervariable. En determinadas circunstancias varios marcadores se asocian con la misma característica genética, en ese caso se dice que forman un QTL o loci de rasgos cuantitativos.

Los marcadores moleculares constituyen una fuente de información extremadamente importante debido a que se encuentran presentes en todos los seres vivos y nos permiten obtener datos a partir de la variabilidad del ADN.

1.3.3. Desarrollo de marcadores moleculares.

Existen dos tipos de marcadores moleculares, los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN. Los primeros marcadores se desarrollaron a finales de los años 70 y se basaban en la identificación de proteínas y **alozimas** mediante detección de variantes electroforéticas de enzimas en geles de almidón, sin embargo este método carecía del polimorfismo necesario para estudiar la heterogeneidad genética entre especies o variedades próximas entre sí, por lo que en los últimos años se han desarrollado marcadores moleculares basados en el ADN gracias a los avances obtenidos en el estudio del ADN recombinante, que son altamente eficaces en la identificación de especies y variedades próximas genéticamente.

Las técnicas más comúnmente utilizadas para identificar **marcadores de ADN** se pueden clasificar en tres categorías principales: técnicas de hibridación (tipo Southern), las de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y por último las que combinan los dos métodos anteriores. La técnica de hibridación tipo Southern se basa en el uso de una enzima de restricción (endonucleasa) que produce variaciones en la longitud o el tamaño de los fragmentos de ADN. En esta categoría se incluyen los marcadores RFLP.

1.3.3.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).

Esta técnica consiste en digerir ADN de distintos organismos con la misma enzima de restricción con el fin de detectar fragmentos de ADN de distinto peso molecular. Se utilizan sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos mediante la identificación de un patrón de bandas en el gel de electroforesis, si bien también se puede llevar a cabo este método empleando la PCR, en cuyo caso se denomina PCR-RFLP. Las deleciones, sustituciones o mutaciones presentes en el genoma pueden modificar el patrón de bandas a identificar de manera significativa, por lo que es aconsejable analizar fragmentos de ADN de pequeño tamaño, obtenidos al digerir el genoma de mitocondrias o cloroplastos. Esta técnica analiza un solo tipo de polimorfismo en cada ensayo, pero el resultado obtenido es altamente preciso.

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa consiste en amplificar fragmentos de ADN utilizando secuencias de nucleótidos que funcionan como cebador o “primer”, esta secuencia cebador es complementaria a una secuencia “blanco” que reconoce y a partir de la cual se empieza a sintetizar el fragmento de ADN correspondiente. (Nuez & Carrillo, 2000). Mediante la PCR se amplifican fragmentos de ADN de 3 a 6 kpb de longitud en condiciones normales.

1.3.3.2. MAAP (Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación).

Este es un término genérico que engloba los marcadores consistentes en oligonucleótidos arbitrarios o minisatélites que generan huellas dactilares complejas, entre ellos destacan:

a. RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar).

Esta técnica se basa en amplificar al azar áreas específicas del genoma mediante PCR; como cebadores se usan un conjunto de decanucleótidos de secuencia aleatoria que se unen a numerosas secuencias del genoma debido a su tamaño y a su baja temperatura de hibridación (36° C) y permiten amplificar mediante PCR numerosos fragmentos de ADN. Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, se obtiene un perfil electroforético de los mismos al separarlos en geles de agarosa, lo que nos dará una idea del grado de polimorfismo de los individuos estudiados y obtendremos una huella dactilar característica. Los polimorfismos se producen por múltiples razones, deleciones e inserciones de nucleótidos, variación de un nucleótido en el sitio de unión al cebador, etc., (Williams *et al.*, 1990) y se visualizan como presencia o ausencia de un producto amplificado.

Esta técnica empezó a utilizarse en 1990 y tiene la ventaja de ser sencilla y rápida, además de requerir pequeñas cantidades de ADN con las que se pueden analizar gran cantidad de loci genéticos (Hadrys *et al.*, 1992). Los RAPDs permiten detectar pequeñas diferencias genéticas que el uso de otras técnicas no diferenciaría. Uno de los inconvenientes de estos marcadores es que no podemos saber la cantidad de copias del fragmento amplificado que contiene el ADN analizado, además suelen ser marcadores dominantes, por lo que no pueden diferenciar loci heterocigóticos. Por otra parte la baja temperatura de hibridación de los cebadores puede desembocar en uniones no específicas (Vale, 2010). El grado de conservación del ADN ha de ser óptimo y las condiciones de la PCR estar ajustadas al máximo para la obtención de unos resultados reproducibles y fiables.

b. AP-PCR (PCR con oligonucleótidos arbitrarios).

Esta técnica es una variación de la descrita anteriormente, la diferencia estriba en el uso de oligonucleótidos más largos y en el diseño de la PCR, ésta consta de dos ciclos iniciales de baja especificidad que amplifican un conjunto de fragmentos de cada variedad a estudiar, seguidamente se realizan una serie de ciclos altamente específicos que nos permiten visualizar los fragmentos anteriores. Para obtener un patrón de bandas

específico se migran los fragmentos amplificados en un gel de agarosa o bien de poliacrilamida que nos dará unos resultados mucho más precisos.

Una variante de este método es el denominado **DAF** (Huellas dactilares por amplificación de ADN), que se basa en el uso de oligonucleótidos de 5 a 15 bases, sin embargo los resultados obtenidos son de difícil interpretación.

c. AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados).

Es un método basado en la combinación de enzimas de restricción y oligonucleótidos, se usan dos enzimas de restricción para cortar el ADN, una de corte poco frecuente y otra de corte muy frecuente, se ligan los oligonucleótidos de PCR a los fragmentos obtenidos y se amplifican mediante dicha técnica, obteniéndose marcadores moleculares muy específicos; para visualizar los resultados obtenidos debe utilizarse un gel de poliacrilamida de alta resolución, ya que en una sola reacción se puede generar gran cantidad de marcadores moleculares.

Además de las técnicas descritas existen otras como la STS, SCAR, CAPS, etc. en las que no profundizaremos ya que se utilizan con menos frecuencia.

Para finalizar, existen metodologías que combinan la hibridación tipo Southern con la PCR, como son los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites).

d. Microsatélites o SSR (Repetición de secuencias discretas).

Dentro de los RFLPs hay loci que son hipervariables, es decir, que tienen muchísimos alelos; esto ocurre en regiones de ADN moderadamente repetitivo, denominándose **minisatélites** si tienen de 7 a 20 pb, y **microsatélites** si el tamaño es de 1 a 6 pb.

Los marcadores microsatélites son un tipo de loci VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable) denominados SSR (repetición de secuencias discretas): segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (normalmente dinucleótidos) que se

repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos; presentan un alto grado de hipervariabilidad y su presencia es frecuente en el genoma de eucariotas, donde se cree que intervienen en el empaquetado y la condensación del ADN dentro de los cromosomas. Estos loci se amplifican mediante PCR con cebadores específicos, generándose fragmentos de distinto tamaño dependiendo del número de repeticiones y esto nos permite caracterizar los alelos de cada locus.

1.3.4. Ventajas y aplicaciones de los microsatélites.

El uso de estos marcadores moleculares en lugar de otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) presenta varias ventajas, por un lado son muy polimórficos debido a la variación que se produce en el número de repeticiones en un locus determinado, además son multialélicos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes, por lo tanto se pueden diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos, son fáciles de medir y analizar y son muy fiables, repetitivos y automatizables, además no son necesarias grandes cantidades de ADN debido a que se obtienen mediante PCR (Zulliger *et al.*, 2009); entre sus principales aplicaciones se encuentran la obtención de “huellas genéticas” de individuos o poblaciones, el establecimiento de relaciones filogenéticas entre individuos y especies, el mapeo de ligamiento, la identificación de QTL (quantitative trait loci) (Fernández-Silva, 2008) o la selección MAS (Marker Assisted Selection) auxiliada por marcadores; por este motivo muchos autores los consideran actualmente la mejor herramienta que se puede emplear en estudios de genética poblacional (Addison & Hart, 2004; Calderón *et al.*, 2009).

Debido al empleo de marcadores en estudios de genómica, en el año 2006 se ha secuenciado el genoma completo de una especie de erizo de mar, el *Strongylocentrotus purpuratus*, este trabajo fue llevado a cabo por el Consorcio del Proyecto para Secuenciar el Genoma del Erizo de Mar (SUGSP), dirigido por el Centro para la Secuenciación del Genoma Humano de la Academia Baylor de Medicina (BCM-HGSC) de Houston. El individuo del que se extrajo el genoma secuenciado era un macho de erizo de mar púrpura de California, obteniéndose 23.300 genes de los cuales 7.077 son compartidos con el ser humano. Los erizos de mar, los humanos y muchos otros

vertebrados compartimos un ancestro evolutivo común de hace 540 millones de años, este antepasado dio lugar al superfilum denominado **deuteróstomos** que incluye a su vez otras filas como los equinodermos, los cordados o el ser humano. Desvelar el genoma de este erizo de mar ha revelado que los lazos genéticos entre esta especie y la nuestra son mucho más cercanos de lo que los científicos esperaban, encontrándose genéticamente más próxima al ser humano incluso que la lombriz o la mosca de la fruta (SUGSP *et al.*, 2006). Por otra parte, comparando los genes secuenciados en el erizo con los genes de nuestra especie, podemos deducir la antigüedad evolutiva de los mismos, además nos permite apreciar la velocidad de cambio evolutivo de estos genes, es decir, cuáles han cambiado lentamente a lo largo del tiempo desde que formaban parte de nuestro antepasado común y cuáles, por el contrario, están evolucionando más rápidamente respondiendo a la selección natural. Otro aspecto del proyecto que asombró a los investigadores fue el sistema inmune de los erizos de mar, que es el más sofisticado de todos los estudiados hasta ahora en cualquier otro animal; se encontraron centenares de familias de genes involucradas en el reconocimiento de bacterias y otros invasores, mientras que en el ser humano sólo podemos hablar de decenas. Se encontraron también genes asociados a enfermedades humanas como la distrofia muscular o el mal de Huntington, además de poseer otros genes asociados al gusto, el olfato, el oído y el equilibrio a pesar de que estos organismos carecen de órganos visuales y auditivos.

1.3.5. Diversidad genética.

1.3.5.1. Definición de población.

Una población se define como el conjunto de individuos de la misma especie que viven en una localidad geográfica determinada y que, real o potencialmente, son capaces de reproducirse entre sí y por tanto comparten un conjunto de genes. Sin embargo, las poblaciones no deberían tratarse como unidades bien definidas ya que generalmente las fronteras geográficas que las delimitan son difíciles de establecer. Una de las características más importantes de una población es su diversidad genética, cuanto mayor sea la diversidad de los genes de una población más capacidad tendrá ésta de

adaptarse a los cambios que se produzcan en su entorno y por lo tanto mayor facilidad para evolucionar.

1.3.5.2. Equilibrio Hardy-Weinberg.

El equilibrio o ley de Hardy-Weinberg (H-W) es un modelo teórico para la genética de poblaciones, fue demostrado independientemente por Godfrey Harold Hardy y por Wilhelm Weinberg en 1908, en Inglaterra y Alemania respectivamente. Esta ley afirma que las frecuencias alélicas de una población mendeliana permanecerán constantes con el paso de las generaciones, es decir, si conocemos las frecuencias alélicas de la población podremos predecir las frecuencias genotípicas de la misma; en el caso de que se produzca un desequilibrio, la población volverá a equilibrarse en la siguiente generación siempre que sea lo suficientemente grande y el apareamiento se produzca al azar.

Para que esta ley se cumpla la población ha de tener unas características determinadas:

1. La población debe ser panmíctica, es decir, en ella todos los individuos deben tener la misma probabilidad de aparearse y este apareamiento se debe producir al azar.
2. Debe ser lo suficientemente grande como para minimizar las posibles diferencias que existan entre sus individuos.
3. No debe estar sometida a migración, mutación ni selección.
4. Las frecuencias génicas y genotípicas han de mantenerse constantes de generación en generación, cumpliendo las leyes de la herencia mendeliana.

La ley de H-W mantiene que para un locus con dos alelos A y a, cuyas frecuencias sean a su vez p y q , las frecuencias genotípicas de los homocigotos AA y aa serán p^2 y q^2 respectivamente, mientras que la frecuencia genotípica para el heterocigoto Aa será $2pq$. Como se puede observar en la figura 1-16, las frecuencias genotípicas de una población que está en equilibrio Hardy-Weinberg se expresan con la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

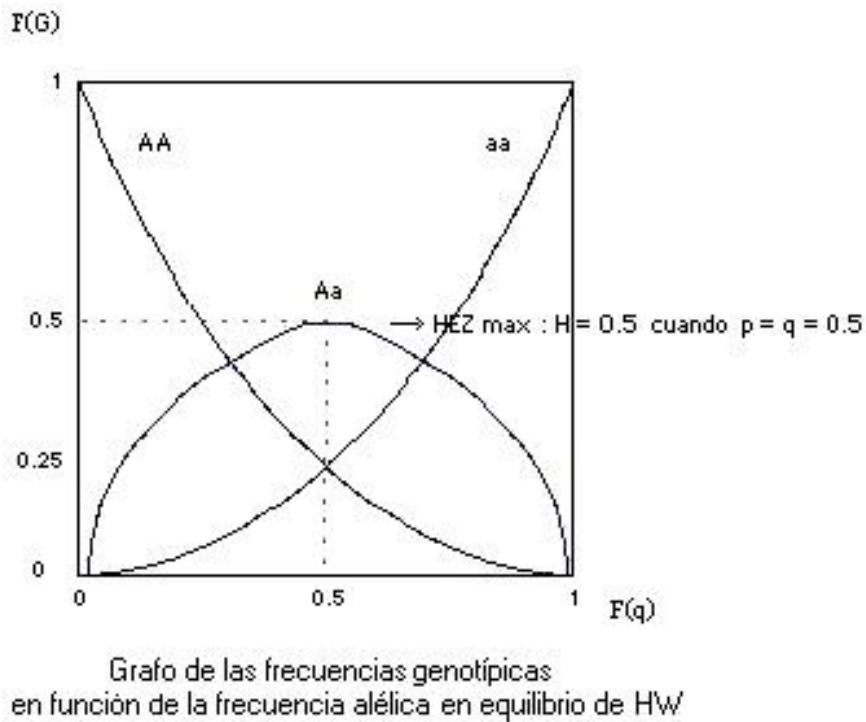


Fig. 1-16.- Representación de la distribución de las frecuencias genotípicas en función de la frecuencia alélica en una población que está en equilibrio H-W. Tomado de: www.atlasgeneticsoncology.org.

1.3.5.3. Diversidad genética. Estimadores.

La diversidad genética de una población o de una especie se entiende como la variación de los genes existente dentro de la misma. Esta diversidad de genes de una población o del conjunto de poblaciones de una especie le confiere la capacidad de mantener un reservorio de variación capaz de encontrar respuestas adaptativas a las variaciones del medio. La frecuencia génica de una población viene dada por la selección natural que favorece las respuestas adaptativas más eficaces para la supervivencia de la especie en las nuevas condiciones ambientales, por tanto la diversidad genética es determinante para la evolución de la población.

La diversidad genética puede estimarse a tres niveles:

- **Genes, P:** de todos los loci analizados (N), P representa la proporción de loci polimórficos = P/N .

- **Alelos, A:** número medio de alelos por locus.
- **Poblaciones:** a nivel de poblaciones podemos estimar la diversidad genética cuantificando la heterozigosis o el coeficiente de endogamia. Suponiendo que existe **equilibrio de Hardy-Weinberg**, la **heterozigosis** esperada es:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

siendo p_i la frecuencia del alelo i de cada locus.

Coeficiente de endogamia: se mide con la siguiente ecuación

$$F_{IS} = 1 - H_o/H_e$$

siendo H_o la heterozigosis observada y H_e la esperada. Si $F_{IS} = 0$ la población está en equilibrio Hardy-Weinberg, si el resultado de la ecuación es positivo esto nos indicaría un defecto de heterocigotos mientras que si fuera negativo indicaría un exceso de los mismos.

1.3.6. Flujo génico y deriva genética.

Una de las características más importantes de una población es su diversidad genética, cuanto mayor sea la diversidad de los genes de una población más capacidad tendrá ésta para adaptarse a los cambios que se produzcan en su entorno y por lo tanto mayor facilidad para evolucionar.

El flujo génico o migración es el intercambio de genes entre dos poblaciones, los individuos que migran de una población a otra se entrecruzan con los organismos ya pertenecientes a esa población, cambian las frecuencias génicas de una zona geográfica, en el caso de que las frecuencias de los migrantes y de los individuos autóctonos no sean iguales; el intercambio de individuos entre las poblaciones producirá un cambio en las frecuencias de los genes en cada una de ellas.

El flujo génico entre dos poblaciones puede tener efectos radicalmente opuestos sobre la diversidad genética de las mismas; si la migración es frecuente, las poblaciones tenderán a homogenizarse, reduciéndose las diferencias entre ellas, pero una migración moderada puede ser también fuente de variación poblacional.

La deriva genética es un proceso que cambia las frecuencias alélicas de una población de forma aleatoria de una generación a la siguiente; esto se debe a que unos individuos de esa población van a tener más descendencia que otros por lo tanto tendrán mayor éxito reproductivo, la frecuencia de los alelos que portan estos individuos será más elevada por puro azar, esto se debe a que cualquier población tiene un número finito de individuos, en este caso no interviene la selección natural para favorecer un cambio evolutivo. El efecto del flujo génico es más relevante en poblaciones de pequeño tamaño donde puede determinar la fijación o la extinción de un alelo en esa población en un periodo de tiempo relativamente corto, este fenómeno disminuye la diversidad genética de la población al favorecer la fijación de un determinado alelo, la deriva genética tiende a formar una población homocigótica, es decir, tiende a eliminar los heterocigotos y por lo tanto la diversidad genética de esa población.

Muchas de las especies de invertebrados marinos que se caracterizan por tener escasa movilidad en su estado adulto, generalmente presentan un nivel moderado o alto de flujo génico, debido a la elevada capacidad de dispersión que poseen las larvas planctónicas de estos individuos (Palumbi & Wilson, 1989), excepto si se da la circunstancia de que existan barreras biogeográficas considerables que impidan esta dispersión (Lessios, 1999; McCartney *et al.*, 2000; Gaither *et al.*, 2010). Sin embargo, debemos tener en cuenta una gran cantidad de factores adicionales tanto físicos como biológicos, ecológicos, etc., que pueden influir en gran medida en la estructura poblacional de estos invertebrados, así como en la evolución espacial y temporal de una población. La población europea actual de *Paracentrotus lividus* se ha desarrollado a partir de una explosión demográfica relativamente reciente ocurrida durante el Pleistoceno tardío.

Los dos factores más importantes que determinan el modelo filogenético en los organismos marinos son la dispersión larvaria y la acción de las corrientes del mar. Las larvas de *Paracentrotus lividus* pasan semanas en el plancton antes de sufrir la

metamorfosis (Uehara & Shingaki, 1985), con lo cual su potencial de dispersión es muy elevado, esta es una característica común a varios organismos marinos cuyas larvas son planctotróficas. Se han descubierto además secuencias idénticas de ADNmt en individuos procedentes de diferentes localidades del área de estudio (mar Tirreno), distantes geográficamente (Iuri *et al.*, 2007). Resultados similares se han obtenido en otros organismos con larvas planctotróficas (Palumbi, 1994), como la especie *Strongylocentrotus purpuratus* estudiada a lo largo de la costa del Pacífico Norte (Palumbi, 1997). Este descubrimiento confirma la alta dispersión geográfica de las larvas, así como la probabilidad de que se produzca una potencial panmixia génica en las zonas carentes de barreras geográficas. El elevado flujo génico de estas especies denota que esas poblaciones no han estado separadas por barreras biogeográficas durante un largo periodo de tiempo, por lo que podemos suponer que las conexiones evolutivas de estos linajes son relativamente recientes, ya que el flujo génico entre ellas se debe a la dispersión natural. Por otro lado se ha observado una diversidad haplotípica sorprendentemente elevada que se atribuye a la expansión demográfica de *P. lividus* durante el Pleistoceno tardío (Durán *et al.*, 2004). Se cree que la expansión de esta especie en el Mediterráneo se produjo después de la última glaciación, hace 18.000 años, dando lugar a poblaciones de gran tamaño, este hecho pudo favorecer una gran variabilidad de haplotipos, derivados de un gran número de mutaciones.

Las poblaciones de erizos que no están genéticamente aisladas presentan diferencias en sus características morfológicas y fisiológicas que son atribuibles a las variaciones en las condiciones medioambientales, es decir, estas diferencias interpoblacionales responden a la presión ambiental (Fernández & Boudouresque, 1997). El índice gonadal presenta también gran variabilidad tanto espacial como temporal (Lozano *et al.* 1995).

Los erizos presentan una elevada plasticidad fenotípica que les proporciona una gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de su hábitat, respondiendo a la variación de parámetros como la temperatura, el hidrodinamismo o la cantidad y calidad del alimento, mediante la adecuación de sus características fisiológicas (tasa de crecimiento, talla máxima, reproducción, morfología, etc.) a la situación medioambiental de su entorno; un ejemplo de este fenómeno es la variación morfológica que se ha observado en *Paracentrotus lividus* al limitar la cantidad de alimento del medio natural donde se encuentran, su respuesta a esta circunstancia es una

disminución de tamaño tanto del diámetro corporal como del índice gonadal, además de un aumento en el tamaño relativo de las estructuras relacionadas con la alimentación (Fernández & Boudouresque, 1997); por otra parte, la deriva genética causada por la presión selectiva del hábitat acentúa la diferenciación de las poblaciones, prueba de ello es que los hábitats estables y los inestables están poblados por comunidades de individuos diferenciadas (Iuri *et al.*, 2007). En el caso de *Paracentrotus lividus*, los hábitats inestables caracterizados por episodios de fuerte presión selectiva experimentan una elevada tasa de mortalidad de los individuos juveniles, mientras que hábitats más estables presentan una tasa de mortalidad más baja y homogénea de los juveniles, lo cual repercute en el posterior desarrollo de poblaciones mejor estructuradas (Turon *et al.*, 1995).

Además de la variabilidad genética es necesario tener en cuenta la variabilidad espacial y temporal de las poblaciones de *P. lividus* características de su propia ecología (Maltagliati *et al.*, 2010), por ejemplo, se han estudiado poblaciones de la costa irlandesa que presentan un incremento del número de individuos así como de la talla media de los mismos durante los meses de otoño e invierno, este fenómeno está relacionado con el cambio del fotoperiodo interanual (Barnes & Crook, 2001).

2. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto y optimización de un sistema de engorde de erizo de mar (*P. lividus*) en el medio natural, usando como infraestructura de soporte del cultivo una batea tradicional utilizada habitualmente para el cultivo de mejillón, así como el estudio de la diversidad genética en diferentes poblaciones de erizos, para su uso en la gestión del cultivo. Este objetivo principal se enmarca dentro de un proyecto más amplio que tiene como título “Cultivo y gestión del erizo de mar (*Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816)”, financiado por los Planes Nacionales de la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), de la Secretaría General de Pesca Marítima, y en la que participan las CC.AA. de Asturias, Canarias y Galicia.

La consecución del objetivo principal, se realizará a través de los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Diseñar y estudiar el comportamiento de estructuras de confinamiento de *P. lividus* en batea, teniendo en cuenta la manejabilidad, eficacia y coste de las mismas.
- 2.- Determinar la eficacia de diferentes dietas, tanto naturales como de diseño experimental, en el crecimiento somático y gonadal.
- 3.- Análisis comparativo de diferentes posibilidades de explotación comercial en batea: engorde de juveniles hasta tamaño comercial; engorde de juveniles hasta tamaño adecuado para repoblación; incremento del índice gonadal en erizos comerciales procedentes del medio natural.
- 4.- Estudio de la diversidad genética en poblaciones de erizos de Asturias, Canarias y Galicia, con el fin de su utilización en la gestión del cultivo, especialmente en el intercambio de reproductores o juveniles entre las comunidades de Galicia-Asturias y la CC.AA. de Canarias.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Instalaciones e infraestructuras de cultivo.

La instalación básica que utilizamos para llevar a cabo este trabajo consistió en una batea experimental perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela (USC), ubicada en el polígono A de la ría de Muros-Noia (situación: **42° 46' 42.34'' N, 8° 57' 27.40'' W**). La batea (Fig. 3-1), construída al modo tradicional de las utilizadas para el cultivo de mejillón en Galicia, tiene una superficie total de 550 m² (22 x 25 m) y dispone de una caseta-laboratorio de 24 m² (3,2 x 7,5 m) donde se realizaron los trabajos de seguimiento y control de las experiencias.

El proceso de elaboración de las dietas experimentales, la recopilación de la información necesaria para realizar el trabajo, estudios de caracterización y diversidad genética y análisis de los datos, se llevó a cabo en las instalaciones del grupo de Sistemática Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la USC (unidad asociada al CSIC), situado en el laboratorio nº 4 del CIBUS (Campus Vida, USC).



Figura 3-1.- Batea donde se realizaron las experiencias.

Para el acceso a la batea, transporte de materiales y obtención de muestras biológicas, se utilizó una embarcación Rodman 700 S-1 de 7 m de eslora y motor intraborda de 100 CV., propiedad asimismo de la USC (Fig. 3-2).



Figura 3-2.- Embarcación Rodman 700-S1 para traslados a la batea.

3.2. Obtención del material biológico para las diferentes experiencias.

3.2.1. Erizos juveniles del medio natural.

La recolección de los ejemplares procedentes de su hábitat natural se ha llevado a cabo en zonas de escasa explotación del recurso, con el fin de optimizar las características poblacionales de los individuos recolectados; se han recogido erizos en cuatro puntos geográficos de la costa gallega: Caveiro (Porto do Son), Corcubión, Lorbé y Areas (Sanxenxo). Una vez seleccionadas las zonas de recolección, la extracción del medio se llevó a cabo empleando espátulas o cucharillas con el fin de despegarlos de la roca causando el menor daño posible al caparazón del animal y reduciendo por lo tanto su

nivel de estrés. Para el transporte desde la zona de recolección hasta la batea se utilizaron neveras portátiles en cuyo interior se mezclaron los erizos con diversas algas extraídas de la zona, realizándose el traslado lo más rápidamente posible y evitando al máximo la manipulación de los ejemplares.

Los erizos fueron mantenidos en estructuras (cajas de plástico de 60 x 40 x 10 cm) sumergidas a 5 metros en la batea, durante una semana, alimentándose con dos especies de algas *ad libitum*: *Laminaria ochroleuca* y *Ulva lactuca*, con el fin de eliminar la mortalidad debida a los daños producidos en el proceso de extracción, antes de realizar la distribución de grupos experimentales (Fig. 3-3).



Figura 3-3.- Estructura metálica con cajas de plástico apilables en su interior .

3.2.2. Erizos juveniles procedentes de criadero.

Se utilizaron erizos procedentes del CIMA de Ribadeo que llegan a la batea en dos tandas, con las características y formación de grupos experimentales que se indican en la tabla 3-1:

Tabla 3-1.- Características de los erizos juveniles procedentes del CIMA de Ribadeo.

GRUPO	1ª TANDA (10-15 mm)	1ª TANDA (5-10 mm)	2ª TANDA (> 10 mm)
Número de erizos	203	390	1000
Diámetro inicial (mm).	12,34±1,55	8,43±1,04	15,38±2,17
Peso inicial (g).	0,87±0,34	0,29±0,12	1,85±0,69
Edad desde el nacimiento (días).	283	283	172-292

El 10 de julio de 2007 recibimos la primera tanda de erizos juveniles que procedemos a distribuir en dos grupos en función de su tamaño:

1. Juveniles grandes: 203 individuos cuyo diámetro oscila entre 10 y 15 mm.
2. Juveniles pequeños: 390 individuos cuyo diámetro oscila entre 5 y 10 mm.

Los erizos se introducen en dos paniers o cestas ostrícolas de 40 cm de diámetro y 10 cm de altura, provistas de cuarterones (Fig. 3-4) con el fin de evitar posibles escapes.



Figura 3-4.- Cesta ostrícola dividida por cuarterones donde se introducen los erizos.

Los 593 erizos juveniles llegados a la batea nacieron en el CIMA de Ribadeo el 30 de septiembre del 2006 y se introdujeron en los paniers divididos por cuarterones. En el panier superior se disponen los 390 erizos cuyo diámetro está comprendido entre los 5-10 mm, distribuidos en cuatro densidades en los cuarterones: 200, 100, 60 y 30 individuos. En el panier inferior se distribuyen los juveniles grandes, cuya talla oscila entre los 10-15 mm, también en cuatro densidades: 100, 50, 30 y 23 erizos en cada cuarterón. Ese mismo día se pesan y se miden, posteriormente se volverán a medir con una periodicidad de un mes y serán alimentados *ad libitum* con una mezcla de algas de las especies *Ulva* spp. y *Laminaria* spp.

El 19 de octubre se lleva a la batea una segunda tanda de erizos juveniles procedentes de cultivo en las instalaciones del CIMA en Ribadeo, nacidos entre enero y mayo de 2007, los erizos de esta segunda tanda se dividen a su vez en dos grupos en función de su diámetro: el primer grupo consta de 820 erizos con un diámetro comprendido entre 10 y 15 mm, el segundo grupo está compuesto por 180 erizos con un diámetro mayor de 15 mm.

Los individuos de 10-15 mm de diámetro de esta 2ª tanda se introducen en uno de los cestillos, que se pierde al romperse las cuerdas que lo sujetaban a la batea. El grupo de juveniles de más de 15 mm de diámetro se incluye en un panier que va suspendido en la parte superior de los otros dos paniers que contenían los erizos de la primera tanda; se repartieron en cuarterones, pero se hace la media de las tallas y del peso porque no están separados por densidades.

3.2.3. Erizos de tamaño comercial.

3.2.3.1. Engorde de gónadas. Experiencia preliminar.

Con el fin de impulsar el cultivo de *Paracentrotus lividus* y su explotación comercial, se planteó un trabajo de investigación analizando el efecto de varios piensos, diseñados y preparados en nuestro laboratorio, sobre el índice gonadal de erizos de tamaño comercial procedentes del medio natural, comparándolos también con grupos alimentados con algas de los géneros *Ulva* y *Laminaria*.

Dado que la parte alimenticia aprovechable de los erizos son las gónadas, la producción de erizos también se podría incrementar indirectamente mediante una explotación mejorada del recurso (Fernández y Boudouresque, 2000; Sánchez-España *et al.*, 2004), comercializándolo cuando la relación entre el peso de las gónadas y el peso total del erizo multiplicado por 100 (IG) sea mayor. Así, un incremento del IG desde un 5% a un 10% significa utilizar la mitad de individuos para conseguir el mismo producto final comercializable para su transformación y consumo.

Durante este experimento lo que se pretende es aumentar el índice de condición de los erizos alimentados por nosotros en la batea, ya sea con algas o con piensos de diverso contenido proteico diseñados en el laboratorio, en comparación con el índice de condición que presentan los erizos extraídos del medio natural.

El 3 de diciembre de 2007 se llevan a la batea 510 erizos de talla comercial (con un tamaño mínimo de 55 mm de diámetro) procedentes de Fisterra, con el objetivo de incrementar el índice gonadal de estos erizos comerciales. Se distribuyen en tres grupos: uno de seis cajas con treinta erizos cada una que serán alimentados con un nuevo pienso que se ha diseñado cuyo contenido en proteína es del 20%, otro grupo con el mismo número de cajas e individuos que será alimentado con otro pienso del 30% de contenido proteico y un último grupo de cinco cajas con 30 erizos cada una que se alimentarán con una mezcla de *Ulva* spp. y de *Laminaria* spp. La alimentación se empieza a suministrar el día 7 de diciembre.

3.2.3.2. Engorde de gónadas.

Este nuevo experimento se basa igualmente en la obtención de un incremento del índice gonadal en erizos de talla comercial, sin embargo en esta segunda fase nos centramos en buscar el incremento del IG a corto plazo. Los grupos experimentales se mantienen un máximo de dos meses con un mismo tipo de pienso (variaciones del pienso inicial del 30% de contenido proteico), para observar si el incremento o la disminución de ciertos componentes pueden influir sobre el IG.

El día 23 de febrero de 2009 comienza la primera experiencia bimensual, se llevan a la batea erizos de talla comercial procedentes de Fisterra, a los cuales se les determina el IG mediante la fórmula:

$$\text{IG} = (\text{peso gónadas/peso erizo total}) \times 100$$

Los erizos se distribuyen en siete grupos, cada uno de ellos se estabula en dos cestas ostrícolas y es alimentado con un pienso que es muy similar al pienso del 30% de contenido proteico que utilizamos anteriormente pero con alguna variación en sus ingredientes, excepto uno de los siete grupos que es alimentado con una mezcla de algas (*Ulva* spp. y *Laminaria* spp.). En total se realizan seis experiencias bimensuales, variando la composición de las dietas suministradas, con el objetivo de determinar la influencia de los distintos componentes sobre el índice gonadal de los erizos.

3.2.4. Erizos para estudios poblacionales.

3.2.4.1. Estudio de diferenciación genética de muestras mediante RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) y secuenciación de ADN mitocondrial para el estudio poblacional de *Paracentrotus lividus*.

Esta actividad ha empezado a desarrollarse en el transcurso del año 2006 mediante la recolección de ejemplares de *Paracentrotus lividus* en diferentes localidades de las tres comunidades autónomas participantes y en otros puntos, con el fin de estudiar la estructura poblacional de esta especie mediante el uso de RAPDs y secuenciación del ADN mitocondrial de las muestras.

a. Análisis preliminar de la diferenciación genética de poblaciones de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, a partir de RAPDs.

En este trabajo han sido analizadas muestras de tres localidades geográficas (Fig. 3-5), con un total de 28 individuos, correspondientes a las CCAA de Asturias (N=5), Galicia

(N=10) y Canarias (N= 13). Las diferentes localidades donde se tomaron muestras y el número de las mismas, se puede ver en la figura 3-6 y en la tabla 3-2.



Fig. 3-5.- Comunidades autónomas donde se han recogido las muestras.

Tabla 3-2.- Localizaciones geográficas y número de erizos analizados.

CC.AA.	Localidad	N	Código ADN
Asturias	Rinconcín	2	C1, F1
	Castropol	3	D2, E2, H2
Galicia	Rinlo	5	A3, B3,C3, D3, F3
	Fisterra	4	A4,B4,C4,D4
	Carnota	1	F5
Canarias	Médano	2	B9,C9
	Tufia	5	A10, C10, E10, F10, G10
	Puerto Naos	2	A11, C11
	La Restinga	4	B12,C12, E12, F12

Esta selección inicial se ha basado, fundamentalmente, en la integridad del ADN aislado a partir de los tejidos de las muestras de erizos, siendo seleccionados aquellos ADNs con escasa y similar degradación.



Fig. 3-6.- Localidades de las tres CC.AA. donde se han recogido los erizos tomados como muestra.

b. Diferenciación genética de poblaciones de *P. lividus* procedentes de Asturias, Canarias y Galicia mediante secuenciación.

Esta experiencia se basa en la amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) de un fragmento de 557 pares de bases perteneciente al gen COI (citocromo c

oxidasa subunidad I) que forma parte del ADN mitocondrial de *Paracentrotus lividus* (Fig. 3-7) y en su posterior secuenciación con el fin de conocer las relaciones filogenéticas existentes entre las distintas poblaciones de erizos estudiadas. Una vez elaborados los análisis de estructura poblacional de los erizos podremos tener una idea del grado de conectividad genética existente entre las poblaciones del noroeste peninsular y las poblaciones de Canarias y diseñar así estrategias de repoblación adecuadas.

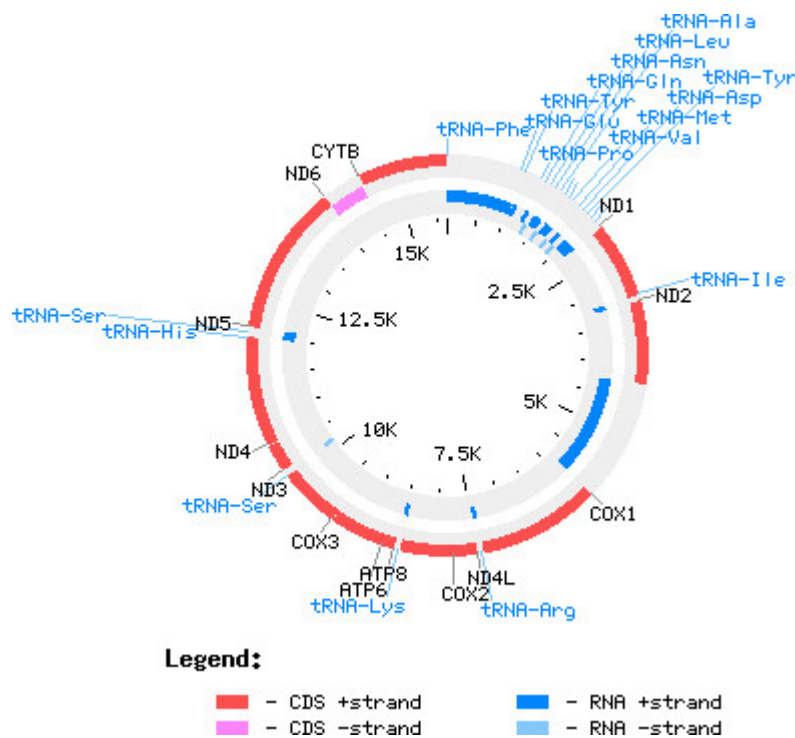


Figura 3-7.- Representación del genoma mitocondrial de *Paracentrotus lividus*.

Las localidades de las tres comunidades autónomas donde se han recogido las muestras son las mismas que aparecen en el apartado 3.2.4.1.a.; en este caso se han seleccionado las muestras procedentes de las siguientes localidades debido a la escasa degradación que presenta su ADN:

- Asturias: Rinconcín y Castropol.
- Galicia: Rinlo, Fisterra, Carnota y Aguiño.
- Canarias: Tufia, Médano y Puerto Naos.

3.2.5. Algas.

Las algas empleadas en la dieta control, además de las que se administrarán posteriormente al grupo de erizos alimentados exclusivamente con algas, son recolectadas en las zonas de las que se han obtenido los erizos, o en la zona costera próxima a la batea. Antes de ser utilizadas como alimento se lavan con agua de mar con el fin de eliminar los posibles sedimentos y epífitos que puedan transportar.

La mayoría de las experiencias de alimentación con algas se realizaron con ejemplares procedentes de las proximidades de la batea y recolectadas en las épocas de mayor abundancia. Para ello, las algas se mantenían congeladas a -20°C (después de su lavado) y se utilizaron durante todo el año sin merma aparente de sus cualidades y consumo por parte de los diferentes grupos de erizos.

3.3. Metodología de los análisis genéticos.

3.3.1. Análisis preliminar de la diferenciación genética de poblaciones de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, a partir de RAPDs.

3.3.1.1. Aislamiento del ADN.

El ADN de las muestras de erizo fue aislado a partir de 30 mg de tejido gonadal preservado en etanol mediante la metodología NucPrep (AppliedBiosystems) en un equipo semiautomatizado ABI 6100 (AppliedBiosystems). El ADN aislado se cuantificó y se evaluó su integridad mediante electroforesis.

3.3.1.2. Análisis genéticos mediante RAPDs.

Una alícuota del ADN aislado fue amplificada con el kit ilustra Ready-To-Go RAPD Analysis (GE Healthcare), en las condiciones descritas por el proveedor y utilizando los cebadores 1, 2 y 3. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de

agarosa 3.5%, documentados en un equipo GelDoc II (Bio-Rad) y analizados con el software Quantity One (Bio-Rad).

3.3.2. Diferenciación genética de poblaciones de *P. lividus* procedentes de Asturias, Canarias y Galicia mediante secuenciación.

3.3.2.1. Aislamiento del ADN.

El ADN fue aislado como se describe en el apartado 3.3.1.1. de este capítulo. La mayor o menor degradación del ADN observada en las muestras nos sirvió como criterio para seleccionar las poblaciones a estudiar en cada una de las tres comunidades autónomas.

3.3.2.2. Amplificación del ADN mediante PCR.

Los cebadores utilizados fueron el COIe-F: 5'- ATA ATG ATA GGA GGR TTT GG-3' y el COIe-R: 5'- GCT CGT GTR TCT ACR TCC AT-3', descritos por primera vez en Arndt *et al.*, 1996.

Se realizaron numerosas pruebas para optimizar las condiciones de la PCR (Polymerase Chain Reaction) con la que se amplifica el ADN de las muestras: se varió la concentración de MgCl₂ (1,5 mM, 2,5 mM, 3,5mM), se probaron diferentes temperaturas de fusión (entre 45°C y 55°C) y se varió la cantidad de ADN utilizado. Además se probaron diversas ADN polimerasas (GoTaq DNA polimerase de Promega y AmpliTaq DNA polimerase de Applied Biosystems).

Para realizar la reacción de PCR empleamos un termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. El volumen total de reacción fue de 15µl, con una concentración de MgCl₂ de 3,5 mM; 0,375 unidades de AmpliTaq DNA Polimerasa, 200µM de cada dNTP y 0,8 µM de cada cebador.

El programa de PCR que utilizamos consiste en una desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos de amplificación (95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto) y un paso final de

extensión de 8 minutos a 72°C. En todas las reacciones se realizó simultáneamente una reacción de control negativo para comprobar que no existiera contaminación con otro tipo de ADN.

3.3.2.3. Verificación de los productos de PCR.

La pureza de los productos obtenidos de la reacción de PCR, descrita en el apartado 3.3.2 de Materiales y Métodos, se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con RedSafe (Intron Biotechnology) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Se sacaron fotografías de los geles utilizando el programa Quantity One de BioRad (Fig. 3-8).

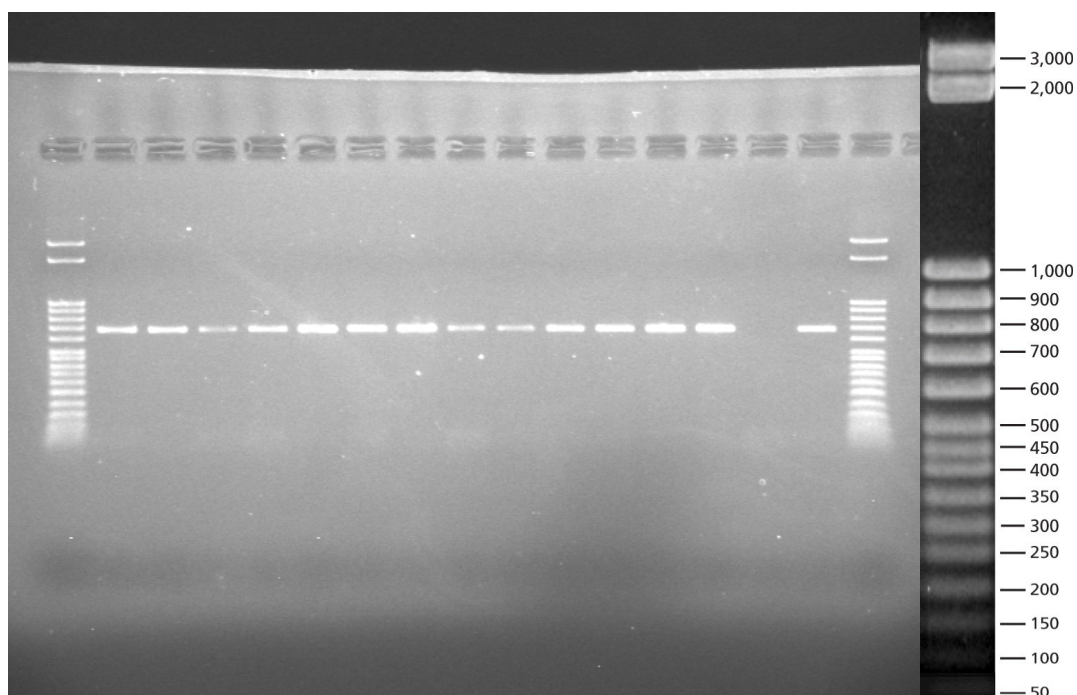


Figura 3-8.- Gel de agarosa donde se pueden visualizar los productos obtenidos de una de las PCRs de un tamaño aproximado de 700 bp.

3.3.2.4. Secuenciación de los productos de PCR.

Los productos de PCR se purificaron utilizando 0,6 µl de Exo-SAP-IT (Amersham-Biosciences) para un volumen de 15 µl de reacción de PCR; este kit contiene las

enzimas fosfatasa alcalina y exonucleasa I, que digieren los cebadores y desactivan los dNTPs libres evitando así que interfieran en la posterior reacción de secuenciación.

La secuenciación se realizó tanto unidireccionalmente, empleando sólo el cebador forward (COIe-F), como bidireccionalmente en algunos casos empleando también el cebador reverse (COIe-R). El volumen de la reacción de secuenciación fue de 10µl y sus componentes fueron: 4 µl del producto de PCR purificado, 1 µl de cebador, a una concentración de 3.2 µM, 1 µl de BigDye Terminator (v3.1) Cycle Sequencing RR-100, 1 µl de 5X Sequencing Buffer y 3 µl de agua mili-Q esterilizada para completar el volumen total.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems, con un programa consistente en una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto y 35 ciclos formados por un primer paso a una temperatura de 95°C durante 15 segundos, una etapa de fusión a una temperatura de 50°C durante 15 segundos y una etapa final de extensión a 60°C durante 2 minutos.

3.4. Toma de datos y tratamiento estadístico.

La toma de datos morfométricos de los erizos se realizó mensualmente. Para calcular el crecimiento somático de los individuos con el tiempo, se utilizará un calibre de la marca Mitutoyo, modelo Digimatic ABS, con una precisión de 0,01 mm, para tomar la medida del diámetro máximo de cada ejemplar excluyendo las púas, así como de la altura máxima del caparazón; el peso de los individuos se determina con una balanza de precisión de la marca Durascale, modelo 100, con una precisión de 0,01 g.

Para realizar el tratamiento estadístico de los datos hemos utilizado el software estadístico R versión R-2.15.0.

3.4.1. Engorde de erizos juveniles procedentes del medio natural.

Este experimento se basó en el engorde de individuos de *Paracentrotus lividus* obtenidos del medio natural cuyo tamaño inicial variaba entre 10 y 20 mm con cinco dietas diferentes, cada grupo de erizos alimentado con una de las dietas se dividió a su vez en tres densidades: 10, 30 y 50 individuos por panier. Durante tres años y nueve meses se obtuvieron medidas del peso, altura y diámetro de cada grupo de erizos (excepto el de pienso de mejillón y el de Ulva, que se perdieron antes de que finalizara la experiencia) con una periodicidad mensual. Los objetivos del tratamiento estadístico de los datos obtenidos son por una parte averiguar si las distintas densidades de cultivo de los erizos influyen significativamente en el crecimiento de los mismos, y por otra si las dietas suministradas a los erizos tienen efecto sobre su crecimiento a largo plazo, y si es así qué diferencia hay entre ellas y qué dietas serían eficaces para un posible engorde de erizos a nivel industrial. Para comparar el crecimiento de los erizos con las distintas dietas sólo utilizaremos las medidas morfométricas obtenidas hasta mayo del año 2009, ya que en esta fecha se pierden los erizos alimentados con pienso de mejillón, por lo que los datos restantes no serían comparables.

Para realizar estos análisis consideramos como variables continuas o variables respuesta el peso, el diámetro y la altura de los erizos y como variable categórica o variable tipo factor la clase de dieta. Un análisis de la varianza (ANOVA) nos permitiría determinar si la variable peso es independiente o no de la clase de dieta, pero para realizar este tipo de análisis los datos deben cumplir el supuesto de normalidad entre otros, para comprobarlo se realizan las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. En caso de que los datos no cumplan los requisitos de normalidad usaremos un test no paramétrico, el test de Kruskal-Wallis para llevar a cabo los análisis.

3.4.2. Engorde de erizos juveniles procedentes de cultivo.

Este experimento se basa en la comparación del crecimiento de los distintos grupos de erizos separados en función de su tamaño, alimentados con una dieta de algas.

Para ello se han calculado las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR) de acuerdo a las fórmulas propuestas por Busacker *et al.*, 1990. Se evaluó además la tasa instantánea de crecimiento (Ricker, 1979), la cual se denomina también tasa de crecimiento específico (TCE).

$$CA = Y_2 - Y_1$$

$$CR = \frac{CA}{Y_1} \cdot 100 = \frac{Y_2 - Y_1}{Y_1} \cdot 100$$

$$TCA = \frac{CA}{t_2 - t_1} = \frac{Y_2 - Y_1}{t_2 - t_1}$$

$$TCR = \frac{Y_2 - Y_1}{Y_1 \cdot (t_2 - t_1)} \cdot 100$$

$$TCE(\% / día) = \frac{(\ln Y_2 - \ln Y_1)}{t_2 - t_1} \cdot 100$$

Donde: CA es el crecimiento absoluto; CR es el crecimiento relativo, TCA es la tasa de crecimiento absoluto; TCR es la tasa de crecimiento relativo; TCE es la tasa de crecimiento específico; Y_1 e Y_2 son el diámetro o el peso al inicio y al final del período experimental; t_1 y t_2 son la duración en días del experimento.

Las medidas morfométricas de los erizos se obtuvieron mensualmente durante 39 meses, desde el 10/07/2007 al 01/04/2011 en los erizos de la primera tanda y durante 37 meses, desde el 02/10/2007 al 01/04/2011 en los erizos de la segunda tanda.

3.4.3. Erizos de tamaño comercial.

3.4.3.1. Engorde de gónadas. Experiencia preliminar.

En este experimento se pretende aumentar el índice gonadal de los erizos procedentes del medio natural; para ello son alimentados en la batea con algas y dos piensos elaborados en el laboratorio, uno del 20% y otro del 30% de contenido proteico. Se trata de comparar el índice gonadal de los erizos del medio natural con el índice gonadal que presentan los erizos obtenidos con las otras tres dietas.

Al llevar a cabo las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks, vemos que la variable cuantitativa ‘índice gonadal’ no cumple el requisito de normalidad, por lo que usaremos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para evaluar hasta qué punto las medidas del índice gonadal son diferentes mediante un contraste de hipótesis.

3.4.3.2. Engorde de gónadas.

En este caso se realizaron seis experiencias bimensuales de engorde de erizos de tamaño comercial con siete dietas diferentes (seis dietas experimentales y una basada en algas), con el fin de comparar el índice gonadal de los erizos alimentados con ellas y el índice gonadal obtenido en los individuos procedentes del medio natural; esto nos permitirá evaluar el efecto de las distintas dietas sobre el índice gonadal de los erizos. Pretendemos comparar los índices gonadales finales obtenidos con cada dieta para evaluar si son significativamente distintos en función de la alimentación suministrada, partiendo del índice gonadal de los erizos del medio natural.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Puesta a punto del manejo y confinamiento de *P. lividus* en batea.

Durante el año 2006 se realizaron diversas experiencias con el fin de determinar las condiciones de trabajo adecuadas para el cultivo de erizos en batea, desde la recogida de juveniles en el medio y su transporte a la batea, hasta el diseño de estructuras de confinamiento y posibilidades que ofrecen diferentes tipos de alimentación. En el diseño de estructuras, se trabajó con la idea de que fuesen lo más económicas posibles (tratando de utilizar sistemas de contenedores ya comercializados para otros usos), que permitiesen condiciones de trabajo seguras y adecuadas para el manejo experimental e industrial.

A principios del año 2007 se realizó una experiencia previa de adaptación de los erizos a las condiciones ambientales y de engorde en las que se mantendrán durante el experimento. El objetivo de este periodo de adaptación consiste en minimizar la mortalidad de los individuos que pueda derivarse del estrés producido por la extracción del medio natural, así como de su transporte hasta la batea y la manipulación a la que son sometidos al introducirlos en las diversas estructuras de cultivo; por otra parte se pretende que todos los individuos, con distinta procedencia geográfica, partan de unas condiciones medioambientales homogéneas y estables antes de iniciar la experiencia de engorde definitiva; este periodo previo de adaptación tiene una duración de dos meses y medio aproximadamente.

4.1.1. Diseño y desarrollo de estructuras de cultivo en batea.

Durante el año 2006 se llevó a cabo el diseño de las estructuras para el engorde de los juveniles, consistentes en cajas de plástico apilables de 60 x 40 cm de superficie y alturas variables (40, 30 y 20 cm), soportadas por una estructura de hierro galvanizado de 60 x 40 x 120 cm (Fig 4-1a) que encuadra al conjunto de 3, 4 ó 6 cajas (según la altura de las mismas) apilables, permitiendo tener una estructura estable que permite soportar las posibles perturbaciones en caso de temporal. La estructura se cierra con un travesaño metálico que va atornillado en la parte superior.

Con el fin de mejorar la manejabilidad y abaratar costes tanto estructurales como de mano de obra, de cara a la producción industrial, especialmente con erizos de tamaño comercial, se diseñaron nuevos sistemas de confinamiento, consistentes en siete cajas apilables de PVC (la última actúa como tapa), de 60 x 40 x 10 cm, que permiten una apertura más fácil para proceder a la alimentación de los erizos, y abaratan costes ya que se elimina la estructura metálica, que se sustituye por cabos que pasan a través de agujeros situados en las cuatro esquinas de la caja (Fig 4-1b). En caso de alimentación con dietas experimentales, el fondo de las cajas se cubre con una rejilla de plástico cuya luz de malla es de 2 x 2 mm, con el fin de que el pienso troceado con el que se alimenta a los erizos permanezca el máximo tiempo posible dentro de las mismas (Fig 4-1c).

Para las experiencias de engorde de erizos juveniles procedentes de criadero, así como para los ensayos con múltiples dietas experimentales, se utilizaron cestillos ostrícolas de plástico apilados, con un diámetro de 40 cm y altura de 10 cm (Fig 4-1d), que en caso de ejemplares muy pequeños llevan cuarterones con un tamaño de malla que evita el escape de los individuos (Fig 4-1e).

Todos los sistemas de cajas o cestillos se suspenden en la batea y se sumergen a una profundidad de 5 m (para la estructura situada en la parte superior de una columna), estimando que es una profundidad adecuada tanto para el desarrollo de los juveniles como para los especímenes de tamaño comercial, debido a que los datos disponibles, para la situación en la que se ubica la batea, no presentan grandes alteraciones de salinidad durante todo el año a esa profundidad.

Los diseños de estructuras de confinamiento se realizaron con el objetivo de que fuese posible su manejo por una sola persona. En el caso de las estructuras más pesadas (cajas con refuerzo metálico y cajas apiladas con erizos de tamaño comercial) este objetivo se puede conseguir mediante el uso de un armazón con rodillo, manejable a través de un sistema de manivela conectado a dos ruedas dentadas unidas por una cadena, diseñada específicamente para la elevación de estructuras de confinamiento de erizos y que, además, permita su desplazamiento por la superficie de la batea (Fig 4-1f).



Figura 4-1. Estructuras para el cultivo de erizos en batea.- Cajas con soporte metálico (a). Columna de siete cajas estabilizado con cabos (b). Detalle de malla situada en el fondo de las cajas (c). Columna de cestillos ostrícolas (d). Detalle de cuarterón en cestillos (e). Sistema de elevación de estructuras de cultivo (f).

4.1.2. Experiencia inicial de adaptación de los erizos al cultivo.

Durante esta experiencia inicial se estudió el efecto de diferentes densidades, tipos de alimento, así como el comportamiento de las distintas estructuras de engorde, con el fin de diseñar las experiencias definitivas y superar la gran mortalidad que se produce debido al proceso de extracción del medio natural. Los datos preliminares del engorde indican que existen diferencias significativas en la mortalidad y el crecimiento de los grupos según el tipo de alimentación. Estas experiencias previas también ayudaron a desechar varios diseños de estructuras de engorde por las dificultades que generaban para la toma de muestras y el suministro de alimentación, así como por problemas de mortalidad o desaparición de ejemplares.

El 24 de marzo de 2007 comienza la experiencia inicial de alimentación, partimos de una cantidad de 250 erizos con un diámetro comprendido entre 10 y 20 mm, obtenidos mediante recolección del medio natural y distribuidos en cinco grupos de cincuenta individuos, cada uno de los cuales es introducido en un cestillo ostrícola. Los cinco cestillos están apilados verticalmente y suspendidos de la batea, la alimentación que se les administra consta de cinco dietas diferentes, una para cada grupo de individuos, basadas en: *Ulva* spp., un pienso diseñado en nuestro laboratorio caracterizado por su composición de mejillón, pienso comercial seco utilizado en la alimentación de orejas de mar, pienso diseñado por nosotros caracterizado por su composición de harina de pescado y *Laminaria* spp.; la alimentación de los erizos se realiza *ad libitum* una vez por semana y con este orden de dietas de menor a mayor profundidad de los cestillos. En el caso del pienso comercial de orejas de mar se suministran 100 g semanales y, en el caso de los piensos diseñados y realizados por nuestro laboratorio, la misma cantidad en porciones rectangulares de 1 cm² y 5 mm de espesor.

El día 31 de marzo de 2007 se realiza una primera revisión del estado de los erizos y de la viabilidad de las diferentes dietas suministradas. Se observa una mortalidad considerable en todos los cestillos, aunque aparentemente la mortalidad del que fue alimentado con *Ulva* spp. es algo menor, esta circunstancia puede deberse a que esta alga ejerce un efecto protector sobre los erizos. El pienso congelado presenta una gran estabilidad en el agua de mar, sin embargo, no aparecen restos del pienso seco; podemos

comprobar también que las laminarias aparecen bastante deshechas, en mal estado de conservación.

El día 2 de abril de 2007 se realiza una nueva recogida de erizos en la playa de Caveiro (Portosón), obteniéndose 330 individuos que se mantienen en la batea alimentados con algas con el fin de compensar la mortalidad inicial. El 29 de abril de 2007 se lleva a cabo otra revisión durante la que se observa una estabilización de la mortalidad, que ahora es muy reducida; aparecen también numerosos erizos fuera de las cajas, adheridos a la estructura metálica externa que las rodea, este fenómeno no se observa en el caso de los cestillos.

A continuación se representan el peso (Fig 4-2) y la mortalidad (Fig 4-3) de los individuos observados con cada uno de los cinco tipos de alimentación. Estos datos corresponden a los erizos introducidos el 24 de marzo de 2007, durante el periodo de adaptación, que tenían una distribución similar de su peso inicial en los cinco grupos.

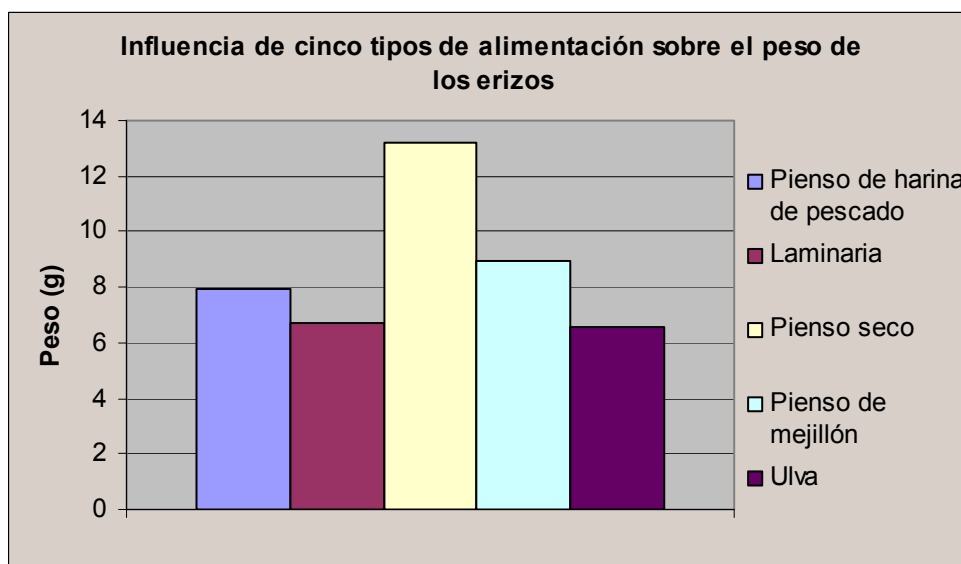


Figura 4-2. Influencia de cinco tipos de alimentación sobre el peso de los erizos.

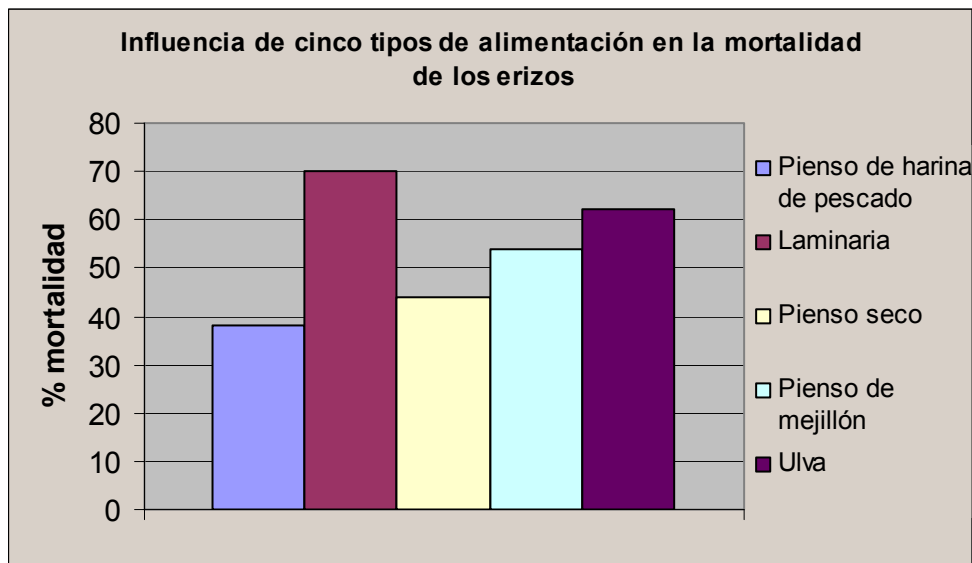


Figura 4-3.- Influencia de cinco tipos de alimentación sobre la mortalidad de los erizos.

La primera toma de medidas morfométricas tiene lugar el 6 de junio de 2007, una vez que se ha comprobado la estabilidad del alimento y se ha minimizado la mortalidad inicial. Los erizos se redistribuyen en cinco grupos de tres cestillos apilados en una cuerda independiente, cada uno de los cuales contiene 30 individuos y es alimentado exclusivamente con un tipo de dieta. Con el fin de comenzar el experimento definitivo, la mortalidad existente se compensa mediante la introducción de nuevos ejemplares que se han mantenido en la batea alimentados exclusivamente con algas. Posteriormente se considera que en lugar de realizar el experimento por triplicado con cada tipo de alimentación sería más interesante la comparación entre tres densidades diferentes para cada grupo, por lo que se sacan 20 erizos de cada panier superior y se introducen en el panier inferior quedando así distribuidos en 3 grupos por alimento de 10, 30 y 50 individuos de arriba a abajo respectivamente, así obtendremos datos de tres densidades por cada grupo de alimentación en lugar de tres réplicas por alimento, lo cual se considera innecesario. Las densidades se sitúan en los paniers en orden creciente de profundidad, es decir, el panier que contiene la densidad 10 es el situado más cerca de la superficie con el fin de minimizar los posibles efectos que pueda ejercer un trasvase vertical de restos de los alimentos de uno a otro panier.

La obtención de medidas morfométricas de los erizos, en el diseño definitivo, se lleva a cabo todos los meses a partir de junio, tomando como referencia diez ejemplares de

cada grupo con el fin de estudiar la evolución del engorde de los individuos con cada tipo de alimentación.

4.1.3. Diseño y elaboración de piensos experimentales.

Para la preparación de dietas experimentales se diseñaron, inicialmente, dos piensos con un contenido proteico del 20% y del 30%. Una vez que tenemos los ingredientes preparados, se realizaron una serie de pruebas con el fin de conseguir una consistencia adecuada, para que su durabilidad en el agua de mar sea al menos de una semana y que su textura sea aceptable para los erizos sin disgregarse a medida que va siendo consumido, ya que se perdería mucho pienso a través de las rejillas de los sistemas de confinamiento.

Empezamos ajustando las cantidades de agua y de gelatina necesarias. Hacemos una primera prueba a pequeña escala utilizando 10 ml de agua para disolver en ella una pequeña porción de los ingredientes sólidos del pienso (6 g), pero esta cantidad es insuficiente ya que no se consigue un alimento compacto. Si se emplean 20 ml de agua se forma una pasta demasiado blanda, obteniéndose la consistencia adecuada con 15 ml de agua y 10 g de ingredientes sólidos.

Paralelamente se realizan pruebas para determinar la cantidad de gelatina necesaria para obtener la consistencia y estructura adecuadas a las características buscadas y que ya se citaron, teniendo en cuenta además que la gelatina es un componente fundamental en la concentración proteica del pienso. Con el 5% de gelatina no se consigue la resistencia necesaria, mientras que con el 10% tenemos problemas con su disolución a una temperatura de 60°C. Para solucionar este problema, se calentó el agua a mayor temperatura, disolviendo en ella la gelatina previamente y añadiendo después el resto de los componentes del pienso ya mezclados. Para terminar, se homogenizan todos los ingredientes con ayuda de una Thermomix y se deja enfriar.

Los piensos se elaborarán en el laboratorio en bloques de 2 kg de peso, con lo cual la parte sólida pesará 800 g y se emplearán 1.200 ml de agua en la preparación de cada pienso.

El 15 de noviembre de 2007 dividimos el pienso obtenido en cuatro porciones con el fin de realizar las pruebas de resistencia en el agua. Una de las porciones se congeló, otras dos se secaron en una estufa a una temperatura de 40° C durante 24 horas, quedando con una consistencia de galletas bastante duras, y la última se introdujo en agua con sal (30‰) para comprobar la duración de sus características en este medio. Después de 5 días (20 de noviembre), la porción que se introdujo en el agua salada mantiene su consistencia. Sometimos también la porción que había sido congelada al agua salada, para comprobar si la congelación previa de cinco días a la que fuera sometida había afectado a sus propiedades. Dos días más tarde comprobamos que ambos fragmentos mantienen sus características. Se introducen también en agua salada las porciones que fueron deshidratadas en la estufa; el 23 de noviembre de 2007 podemos observar que las porciones que se habían secado en la estufa vuelven a estar hidratadas y conservan la consistencia. El 26 de noviembre siguen conservando la consistencia pero ya empieza a deshacerse por los bordes, por lo que estimamos que se obtiene una mayor estabilidad en el agua salada con el pienso fresco o congelado.

También se introdujeron algas en la estufa a 40° C para deshidratarlas, comprobando que hay que meter una cantidad muy pequeña debido a que necesitan mucho tiempo de secado, desprenden muy mal olor y aparecen hongos debido a la humedad que conservan.

Finalmente optamos por conservar los piensos congelados antes de emplearlos para alimentar a los erizos. Las algas deben recolectarse frescas, pero se pueden congelar y utilizarse sin problemas para la alimentación de los erizos, ya que no es viable, con los medios disponibles, conservarlas deshidratadas.

4.2. Efecto de diferentes dietas y densidades sobre el crecimiento de juveniles de *P. lividus* obtenidos del medio natural.

Numerosos estudios previos (Lawrence *et al.*, 1989, 1992; Fernández & Pergent, 1998; Daggett *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Cook & Kelly, 2007) han demostrado la influencia de la cantidad y calidad del alimento disponible sobre la morfología y la fisiología de los erizos de mar, además, otros factores como las cualidades alimenticias de la dieta, el tamaño de los individuos y la duración del experimento afectan también a los parámetros nutricionales.

Otros trabajos destacan la importancia del aporte proteínico en el crecimiento y desarrollo de los erizos de mar, constituyendo el componente principal de todos sus órganos a nivel bioquímico (Fernandez, 1998; Fernandez & Pergent, 1998; Fernandez & Boudouresque, 2000; Senaratna *et al.*, 2005; Schlosser *et al.*, 2005). El uso de una dieta de altas cualidades nutritivas para el engorde del erizo puede influir de manera determinante en la composición bioquímica del individuo adulto (Fernández, 1997), la utilización de una dieta con alto contenido proteico favorecerá el almacenamiento de sustancias de reserva en las gónadas en forma de lípidos y carbohidratos (Fernández, 1997), o bien un aumento de tamaño de las mismas (McBride *et al.*, 1997).

Por este motivo hemos diseñado dietas experimentales que traten de incrementar el crecimiento somático y gonadal, utilizando gelatina como fuente principal de proteínas, complementada con mejillón que además de reforzar el aporte proteico de la misma constituye una fuente natural de β -caroteno; la adición de este pigmento natural contribuye a mejorar la coloración de las gónadas (Robinson, 2002; Pearce *et al.*, 2004), estimando además que no influirá modificando el sabor de las gónadas de los individuos que hayan sido alimentados con esta dieta.

4.2.1. Objetivo.

Determinar la influencia de cinco dietas y tres densidades de cultivo sobre el crecimiento de erizos recolectados del medio natural.

4.2.2. Materiales y métodos.

Se utilizaron un total de 450 erizos obtenidos del medio natural (tamaño entre 10 y 20 cm) y mantenidos previamente en la batea, alimentados con algas, hasta que se estabiliza la mortalidad. Se dividen en cinco grupos, uno por cada tipo de dieta, disponiéndose en cestillos ostrícolas (40 cm de diámetro y 10 cm de altura). Cada grupo contiene cuatro cestillos, uno superior que actúa como tapa, y los siguientes con 10, 30 y 50 erizos, disponiéndose los cestillos con la densidad creciente hacia el fondo para tratar de minimizar, en lo posible, la influencia de los restos de la dieta de los cestillos superiores sobre los individuos de los inferiores.

El primer grupo de erizos de cada estructura es alimentado con una dieta comercial elaborada para la alimentación de abalones, cedida por la empresa GMA (Galician Marine Aquaculture). El segundo grupo se alimenta con una dieta de harina de pescado; al tercer grupo se le suministra una dieta específica para erizo, que diseñamos expresamente antes de comenzar el engorde, cuyo aporte proteínico principal es el mejillón, que además actúa como fuente natural de β -caroteno. Finalmente, los dos últimos grupos se alimentan con una dieta de *Laminaria* spp. y *Ulva* spp. respectivamente. La composición de los piensos de harina de pescado y de mejillón se detalla en la tabla 4-1.

Tabla 4-1.- Composición de los piensos de harina de pescado y de mejillón.

Pienso de harina de pescado		Pienso de mejillón	
Componentes	%	Componentes	%
Harina de pescado	5,41	Mejillón	32,8
Laminaria	19,67	Algas (varias especies)	20,0
Mezcla de polisacáridos	1,18	Mezcla de polisacáridos	1,2
Gelatina	7,37	Gelatina	6,0
Agua	66,37	Agua	40,0

Previamente al diseño de la composición de la dieta es necesario tener en cuenta diversos factores, por ejemplo, que exista una proporción adecuada de proteínas, hidratos de carbono, pigmentos, sales minerales, etc. El contenido en carbohidratos de la dieta así como la tasa de ingestión del alimento están relacionados de forma

inversamente proporcional al nivel de absorción de los nutrientes por parte de los erizos (Fernandez & Boudouresque, 2000).

Uno de los factores determinantes para la posterior comercialización de los erizos es el color de sus gónadas, las que más valor comercial alcanzan son las de color naranja brillante, que adquieren esta coloración debido a su contenido en β -caroteno; el pigmento más abundante presente en los erizos es la equininona, que el animal usa como precursor en la síntesis de β -caroteno, cuanto más equininona haya en las gónadas, más intensa será su coloración. Se cree que la síntesis de β -caroteno a partir de este pigmento tiene lugar en la gónada debido a que la concentración de equininona en este órgano es significativamente más elevada que en el resto del erizo, e inversamente proporcional a la concentración de β -caroteno en la misma. (Shpigel *et al.*, 2006). Se han llevado a cabo numerosos experimentos con dietas artificiales enriquecidas con carotenos con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos a nivel de color y sabor de las gónadas, pero hasta el momento los erizos alimentados con dietas naturales han superado con creces en este aspecto a todos los experimentos realizados con dietas artificiales (Goebel & Barker, 1998); por otra parte, los carotenoides elaborados artificialmente para intensificar el color de las gónadas incrementan considerablemente los costes de producción y no proporcionan resultados satisfactorios (Torrissen *et al.*, 1990), por eso basamos la dieta experimental diseñada en una fuente natural de proteínas y de carotenos como el mejillón, con la esperanza de mejorar tanto el color como el sabor y la textura de las gónadas que se obtengan. El contenido proteico de esta dieta oscila entre un 10-11%.

El proceso de preparación consistió en disolver la gelatina en agua caliente con el fin de incluir en ella cada uno de los ingredientes, que se han triturado previamente hasta obtener fragmentos de no más de 3 mm de diámetro; esta mezcla triturada se introduce en la gelatina líquida y se homogeniza, vertiendo la mezcla en un molde que al enfriarse adquiere una consistencia considerable debida en su mayor parte a las proteínas que contiene. El alimento final que obtenemos presenta la forma de un flan (Fig. 4-4) que puede cortarse después a conveniencia, sin perder sus propiedades nutritivas al conservarse congelado, y con una estabilidad dentro del agua que asegura su

permanencia en perfectas condiciones durante al menos 7 días después de ser introducido en las estructuras sumergidas de la batea.



Figura 4-4.- Pienso de mejillón una vez elaborado. (Foto: M Rey).

Su consistencia es además adecuada para que los erizos puedan consumirlo con total facilidad, asegurando que cada porción que consuman les aporte una cantidad proporcional de cada uno de los nutrientes, debido a la distribución perfectamente homogénea de éstos dentro de la matriz de gelatina. El bloque de alimento que hemos preparado se descongela y se corta en láminas más pequeñas para facilitar la accesibilidad del mismo a todos los individuos, éstos son alimentados *ad libitum* una vez por semana.

Por último, otro de los grupos se alimenta exclusivamente con algas del género *Laminaria* spp., y el quinto grupo sería alimentado con una dieta basada en *Ulva* spp. Al administrar estas cinco dietas diferentes para engordar los erizos pretendemos comparar

resultados en cuanto a mayor incremento del crecimiento en un periodo de tiempo determinado.

4.2.3. Resultados y discusión.

En junio de 2007 se tomaron las primeras medidas de los ejemplares estabulados en la batea, obteniéndose datos del peso, del diámetro y de la altura de cada uno de ellos. La obtención de las medidas morfométricas de los erizos se lleva a cabo todos los meses, tomando como referencia diez ejemplares de cada grupo y densidad, con el objetivo de estudiar la evolución del crecimiento de los individuos con cada tipo de alimentación.

Los datos que a continuación se presentan (Tabla 4-2) se corresponden con el período que comprende desde el inicio del experimento hasta el 2 de abril de 2011 (excepto para los erizos alimentados con el pienso con mejillón, cuya última medida fue el 16 de mayo de 2009, y para los alimentados con Ulva, cuyos últimos datos morfométricos fueron obtenidos el 30 de noviembre de 2009, en ambos casos por desaparición repentina de las estructuras y del grupo experimental).

Una vez calculada la media y la desviación estándar de cada grupo de individuos, elaboramos los gráficos representativos de la evolución temporal de estos factores con cada dieta (Figuras 4-5 a 4-22).

Tabla 4-2.- Medidas morfométricas de los erizos desde el inicio del experimento hasta su finalización.

Dieta	Días de cultivo	Densidad	Diám. inic. (mm)	Diám. final (mm)	Incremento %	Altura inic. (mm)	Altura final (mm)	Incremento %	Peso inic. (g)	Peso final (g)	Incremento %
Pienso con mejillón	703	50	27,86±3,33	37,57±4,74	34,85	13,94±2,13	19,00±2,07	36,3	9,94±3,11	21,80±7,25	119,32
		30	27,07±2,95	41,03±3,14	51,17	13,07±1,66	20,18±2,25	54,4	9,68±2,40	25,00±6,88	158,26
		10	30,30±1,64	45,77±1,58	51,06	14,70±0,82	22,39±1,72	52,31	12,56±2,01	33,50±6,75	166,72
Pienso harina pescado	1723	50	26,28±4,27	42,34±3,19	61,11	12,66±2,43	20,42±2,12	56,16	8,10±3,17	32,70±6,46	303,70
		30	26,90±2,14	42,55±5,51	58,18	12,83±1,58	20,42±3,28	53,08	8,56±1,87	30,34±12,4	254,44
		10	26,20±2,49	46,59±1,92	77,82	12,10±1,79	23,19±1,67	86,61	8,04±1,97	42,69±8,05	430,97
Pienso Oreja de mar	1723	50	28,20±5,12	42,44±2,59	50,50	14,36±3,10	20,38±2,02	35,45	10,98±3,99	31,57±6,34	187,52
		30	28,23±2,34	42,93±4,65	52,07	13,83±1,78	20,60±1,84	54,66	10,84±2,75	33,50±9,06	209,04
		10	25,90±3,31	47,36±2,98	82,86	12,80±1,87	24,45±2,64	79,84	8,52±2,96	43,67±8,75	412,56
Laminaria	1723	50	25,14±4,41	45,94±6,78	82,74	12,22±2,34	22,10±3,31	98,69	8,11±3,26	40,00±15,9	393,22
		30	29,23±2,13	48,21±4,25	64,93	13,97±1,85	23,93±2,74	75,16	11,27±2,36	46,98±12,4	316,86
		10	27,40±2,84	55,99±3,19	104,34	13,30±1,77	28,31±1,06	105,86	9,87±2,42	69,40±10,1	603,14
Ulva	870	50	26,68±3,49	45,91±3,12	72,08	13,74±2,53	24,01±2,29	74,75	9,47±3,76	35,48±7,70	274,66
		30	29,03±2,99	49,14±3,67	69,27	15,03±1,77	26,23±3,29	74,52	12,46±3,35	42,24±10,3	239,00
		10	30,20±1,75	50,82±4,36	68,28	15,80±1,55	26,85±1,77	69,94	13,76±2,78	45,06±10,0	227,47

4.2.3.1. Evolución del peso de los erizos con cada tipo de alimentación.

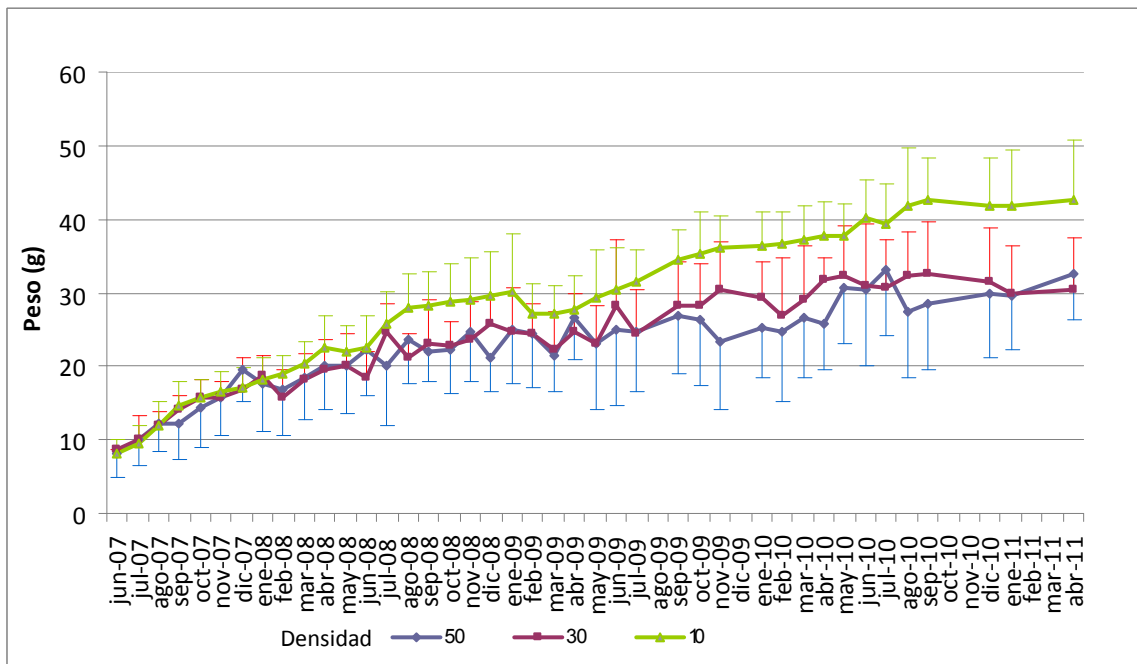


Figura 4-5.-Evolución del peso de los erizos alimentados con harina de pescado con 3 densidades.

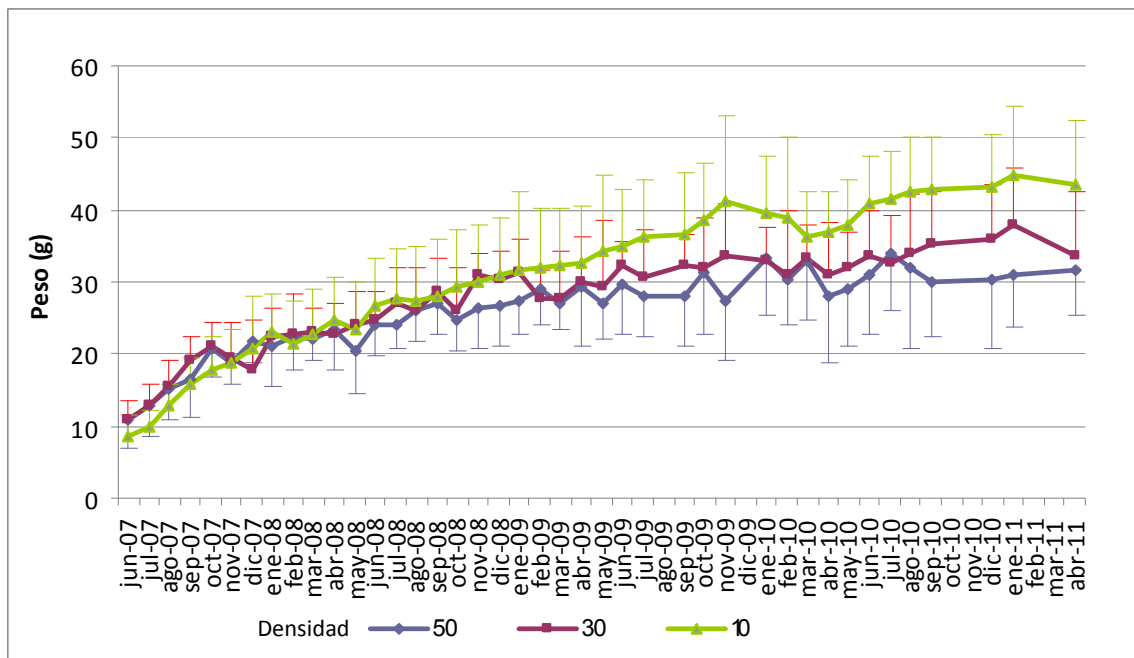


Figura 4-6.- Evolución del peso de los erizos alimentados con pienso seco con 3 densidades.

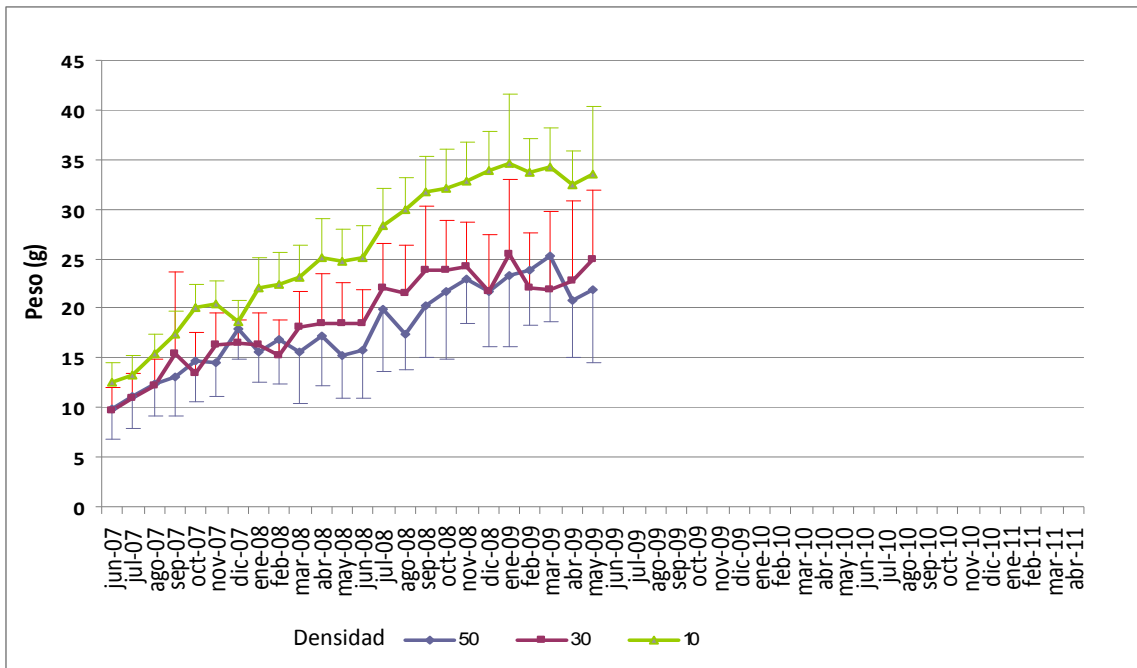


Figura 4-7.- Evolución del peso de los erizos alimentados con pienso de mejillón con 3 densidades.

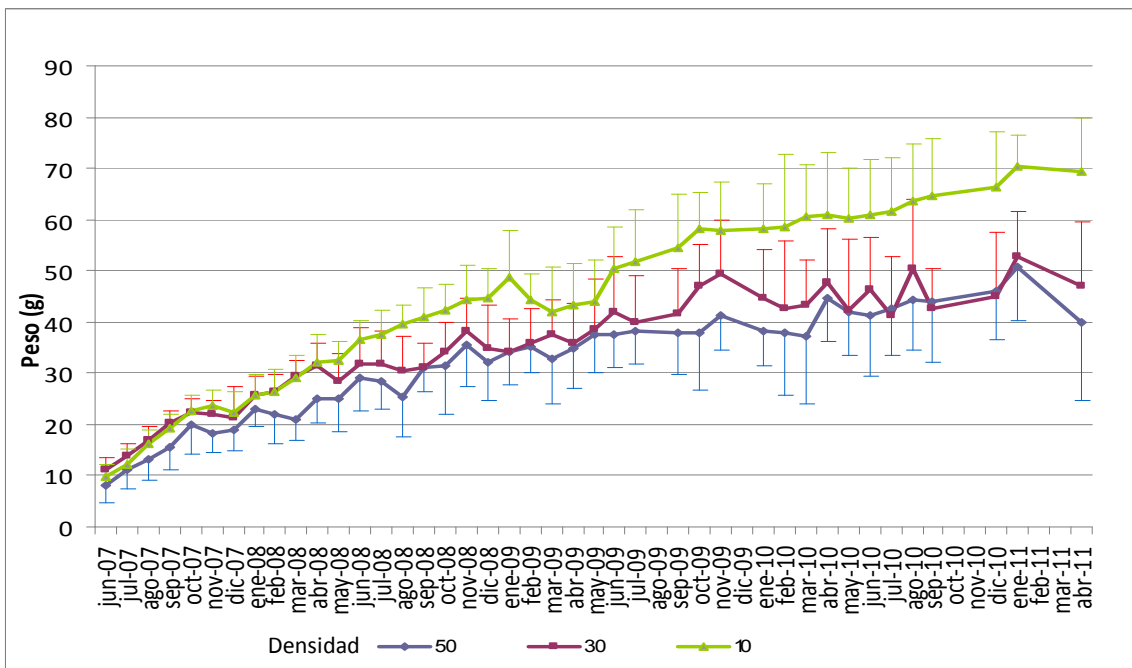


Figura 4-8.- Evolución del peso de los erizos alimentados con Laminaria con 3 densidades.

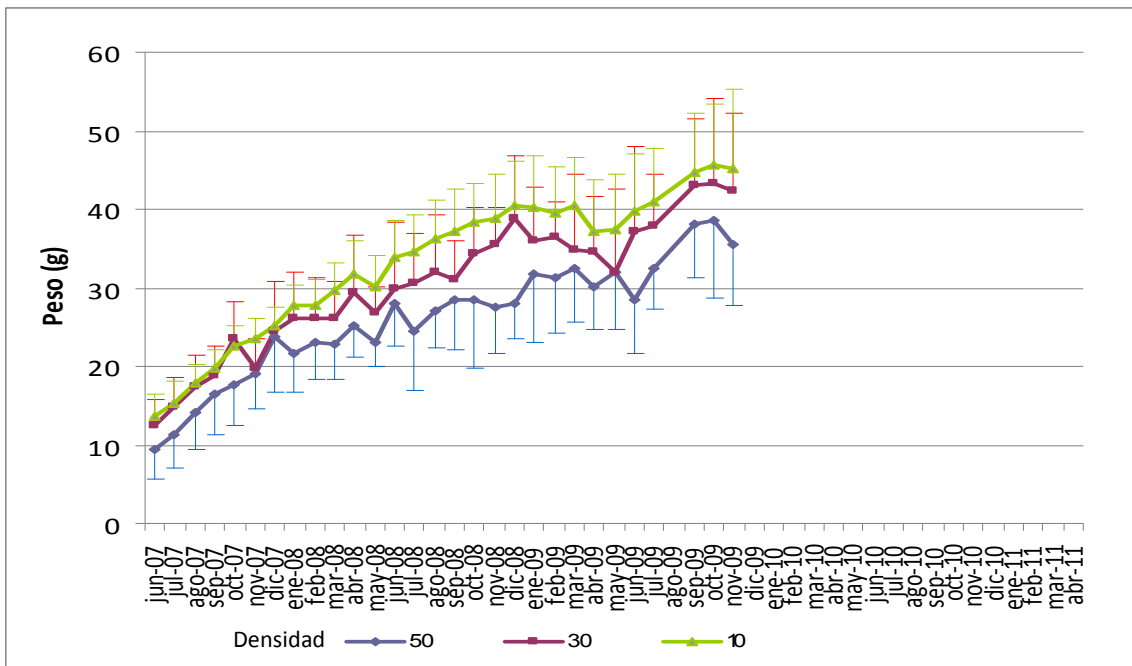


Figura 4-9.- Evolución del peso de los erizos alimentados con Ulva con 3 densidades.

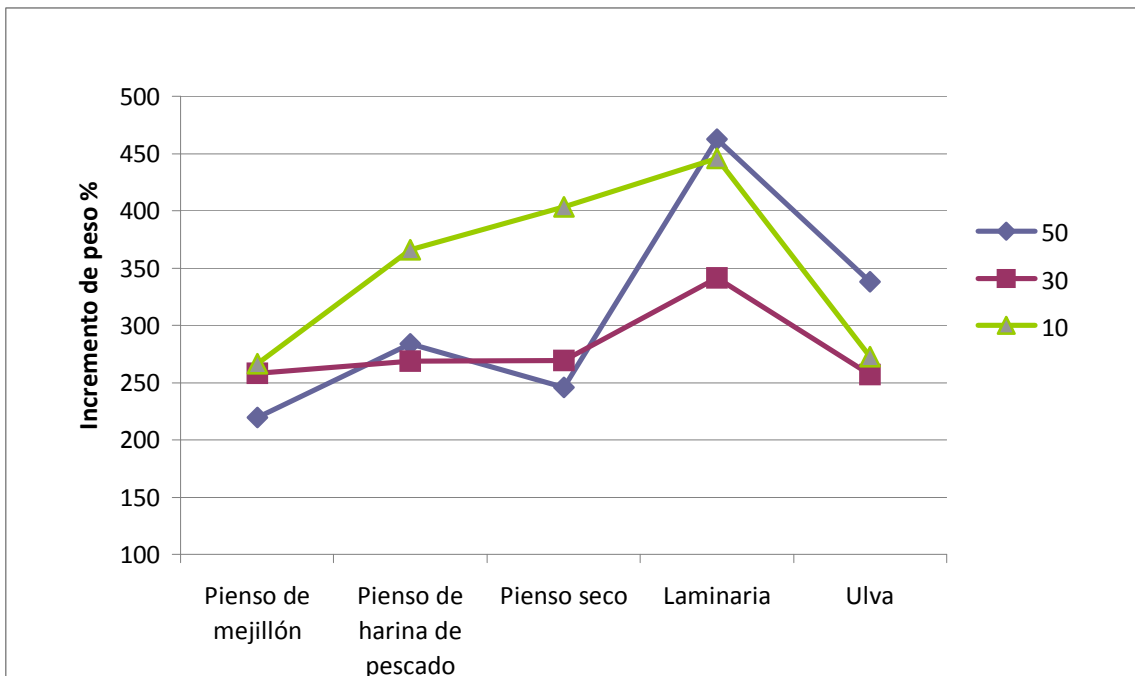


Figura 4-10.- Porcentaje de incremento de peso con tres densidades y las cinco dietas. Los datos con los que se elaboró la gráfica corresponden a los primeros 703 días de cultivo, fecha en la que se mantenían los 5 tipos de alimentación.

4.2.3.2. Evolución del diámetro de los erizos con cada tipo de alimentación.

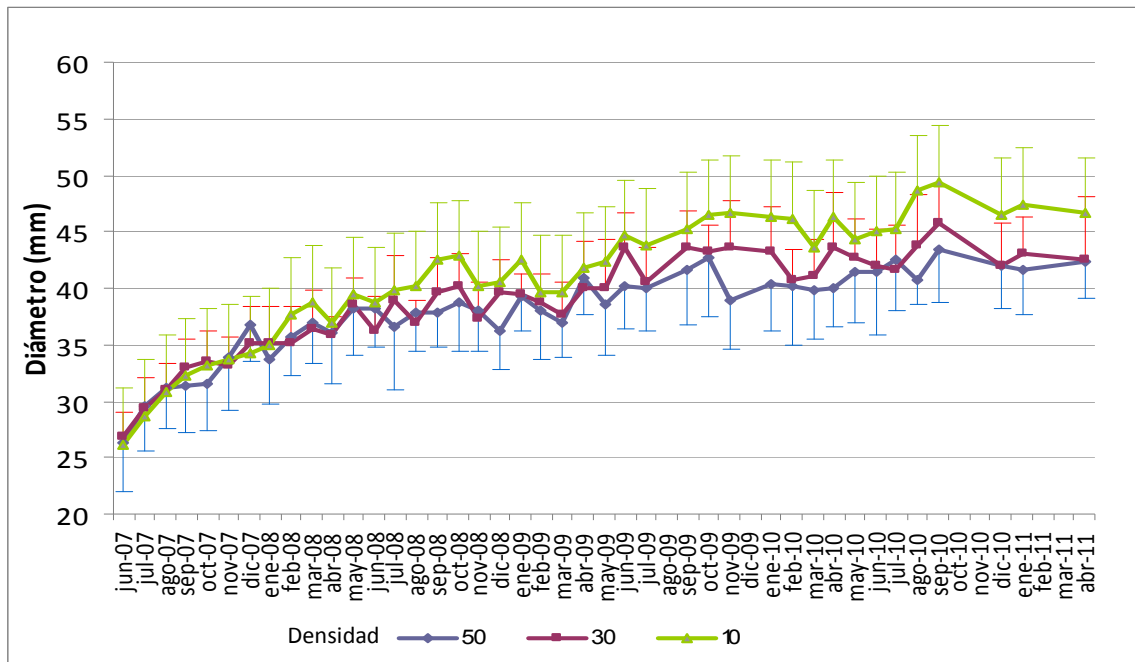


Figura 4-11.- Evolución del diámetro de los erizos alimentados con pienso de harina de pescado con 3 densidades.

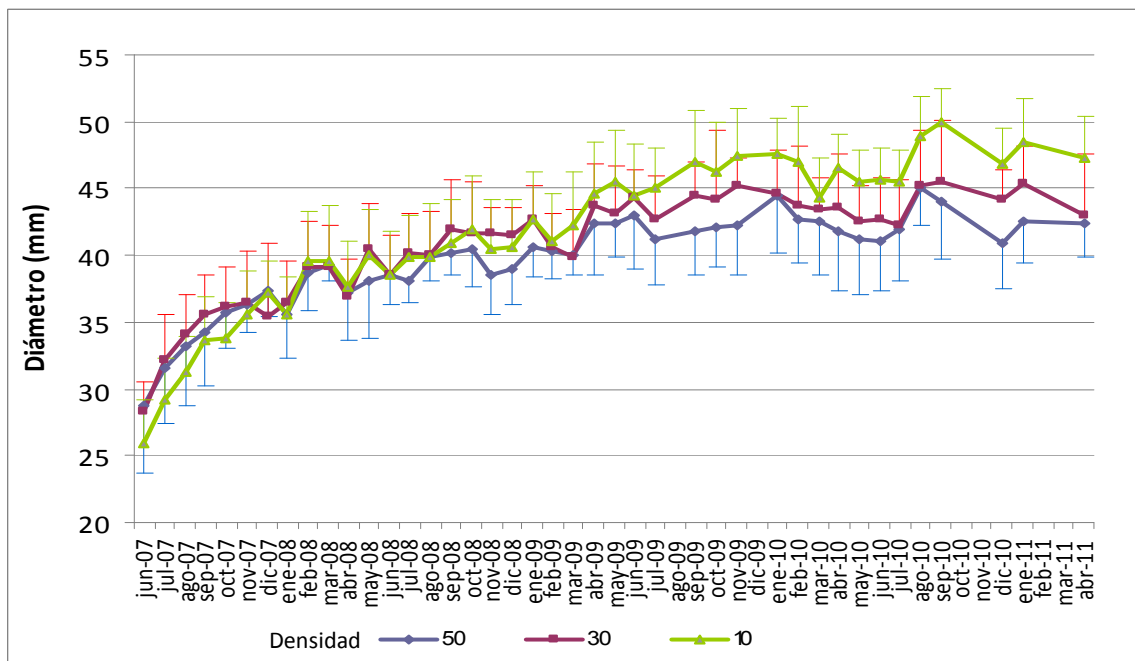


Figura 4-12.- Evolución del diámetro de los erizos alimentados con pienso seco con 3 densidades.

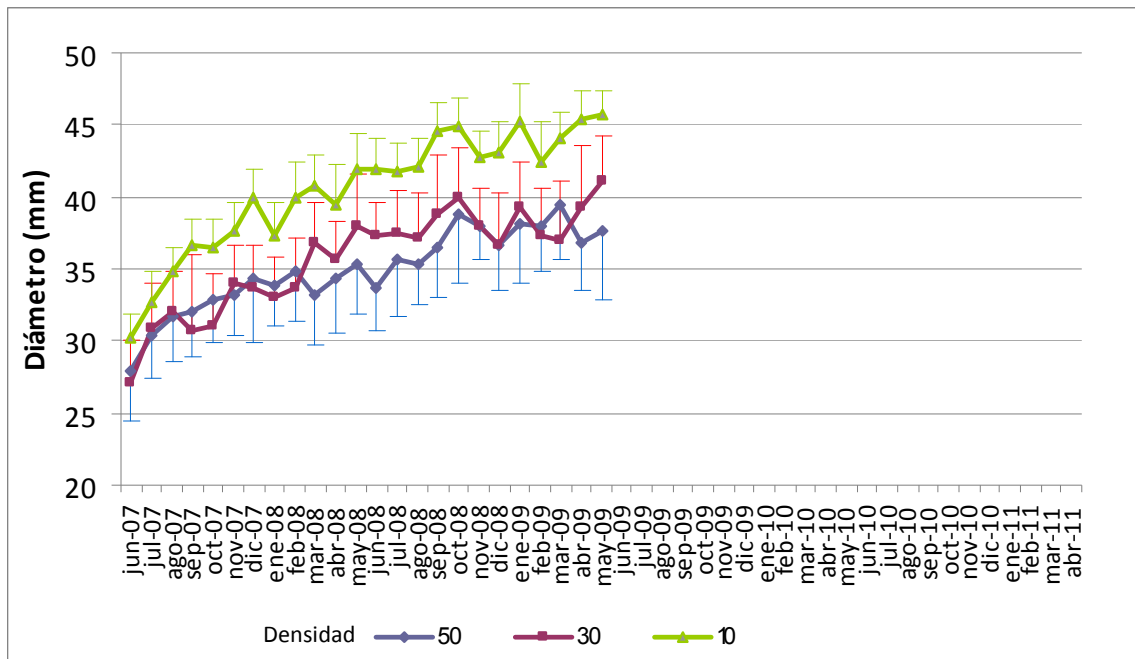


Figura 4-13.- Evolución del diámetro de los erizos alimentados con pienso de mejillón con 3 densidades.

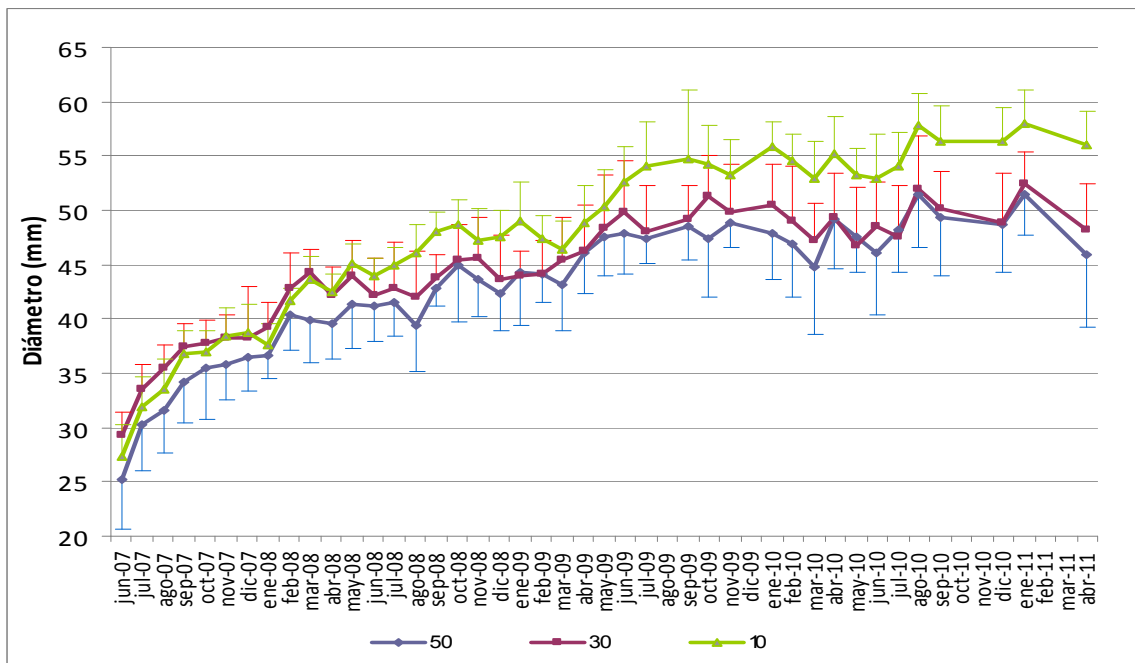


Figura 4-14.- Evolución del diámetro de los erizos alimentados con Laminaria con 3 densidades.

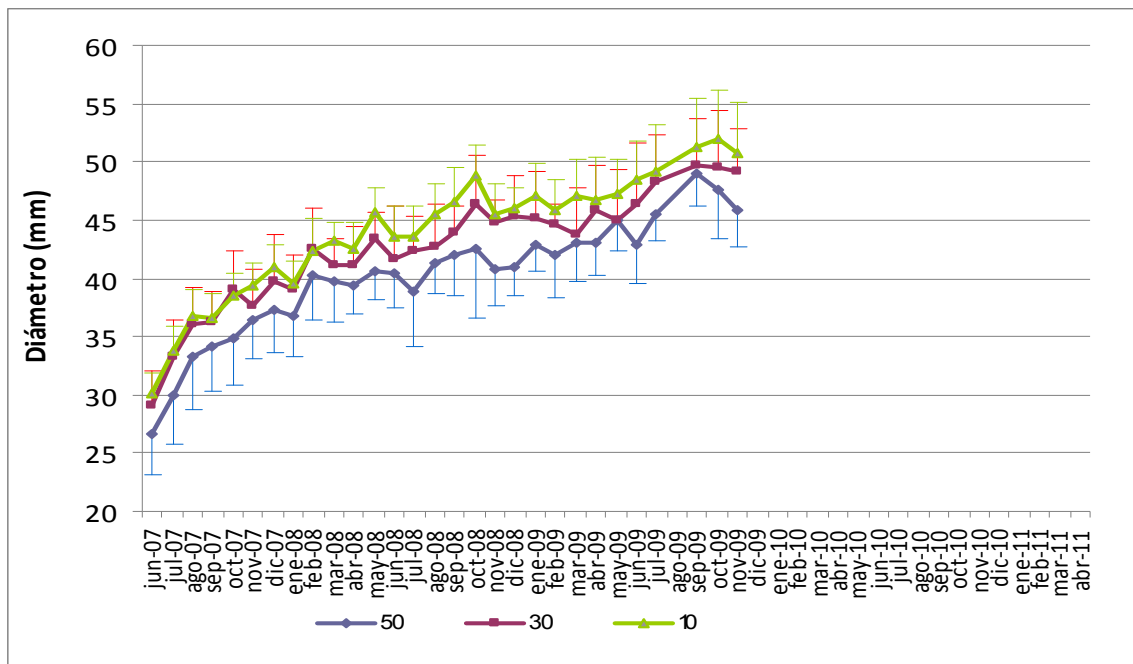


Figura 4-15.- Evolución del diámetro de los erizos alimentados con *Ulva* con 3 densidades.

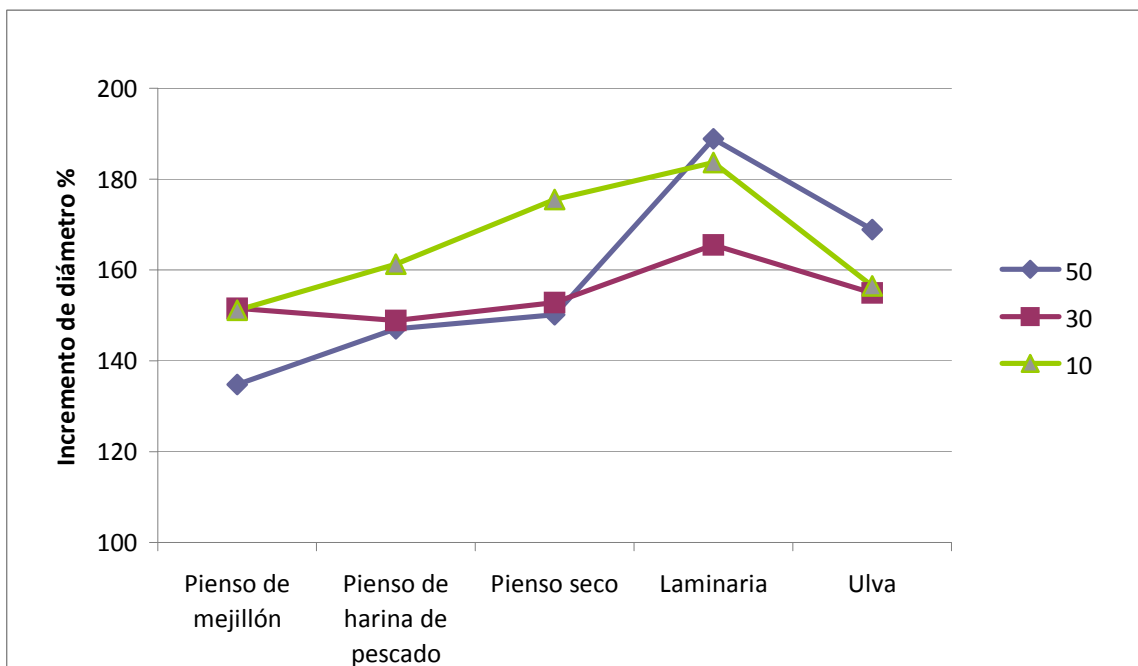


Figura 4-16.- Porcentaje de incremento de diámetro de los erizos con 5 dietas y 3 densidades elaborada con los datos de los 703 primeros días de cultivo.

4.2.3.3. Evolución de la altura de los erizos con cada tipo de alimentación.

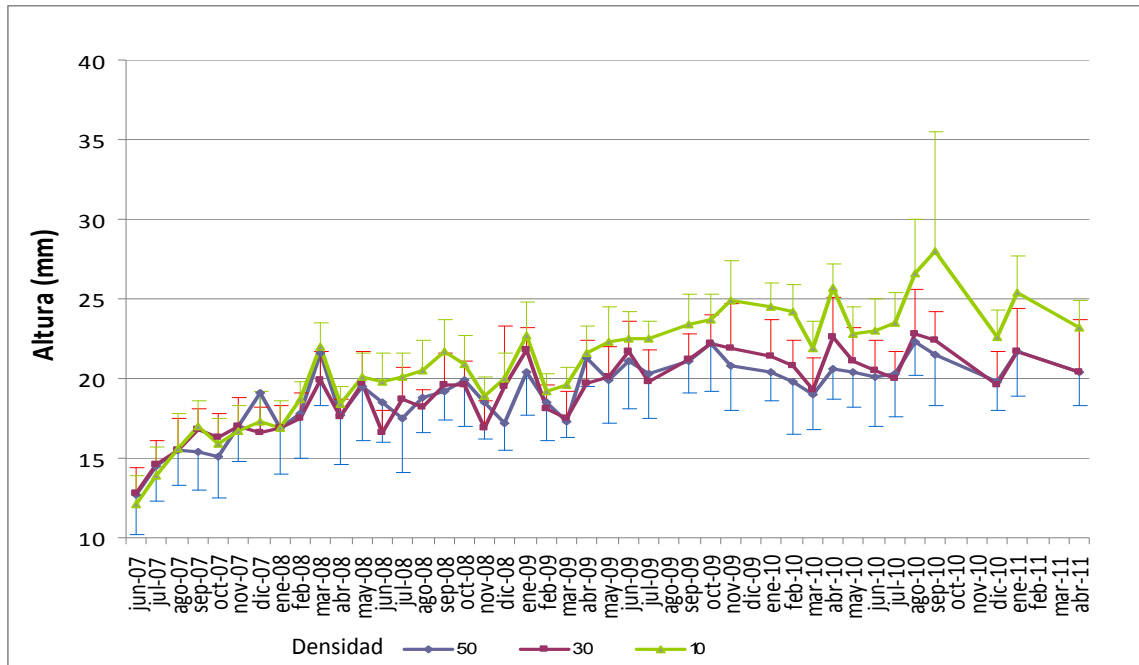


Figura 4-17.- Evolución de la altura de los erizos alimentados con pienso de harina de pescado con 3 densidades.

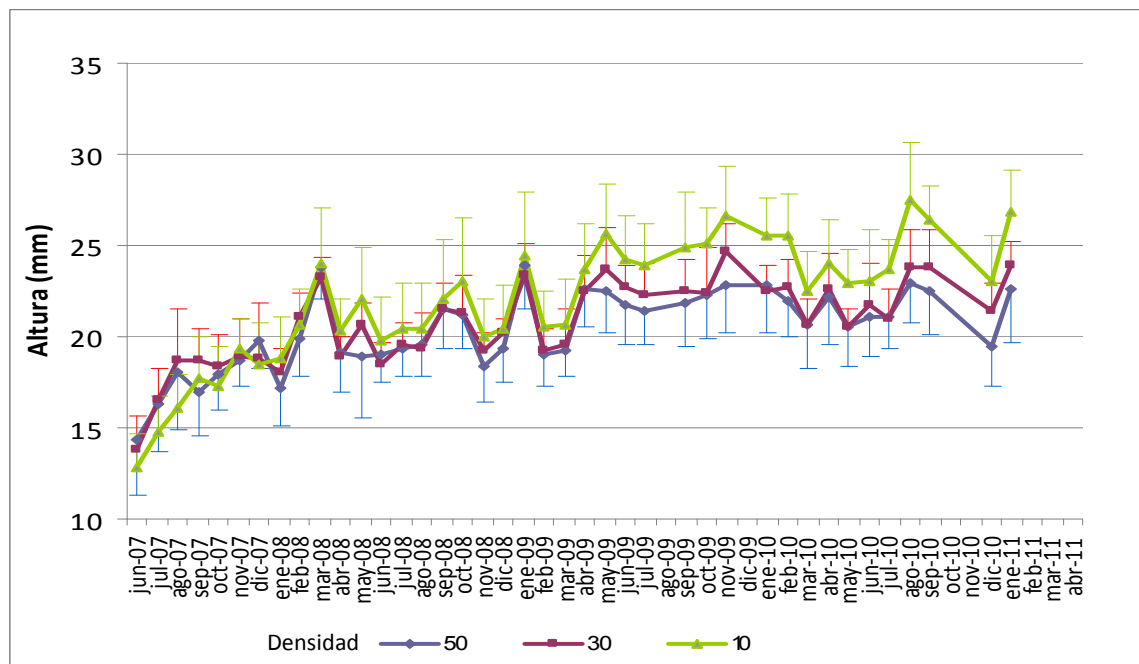


Figura 4-18.- Evolución de la altura de los erizos alimentados con pienso seco con 3 densidades.

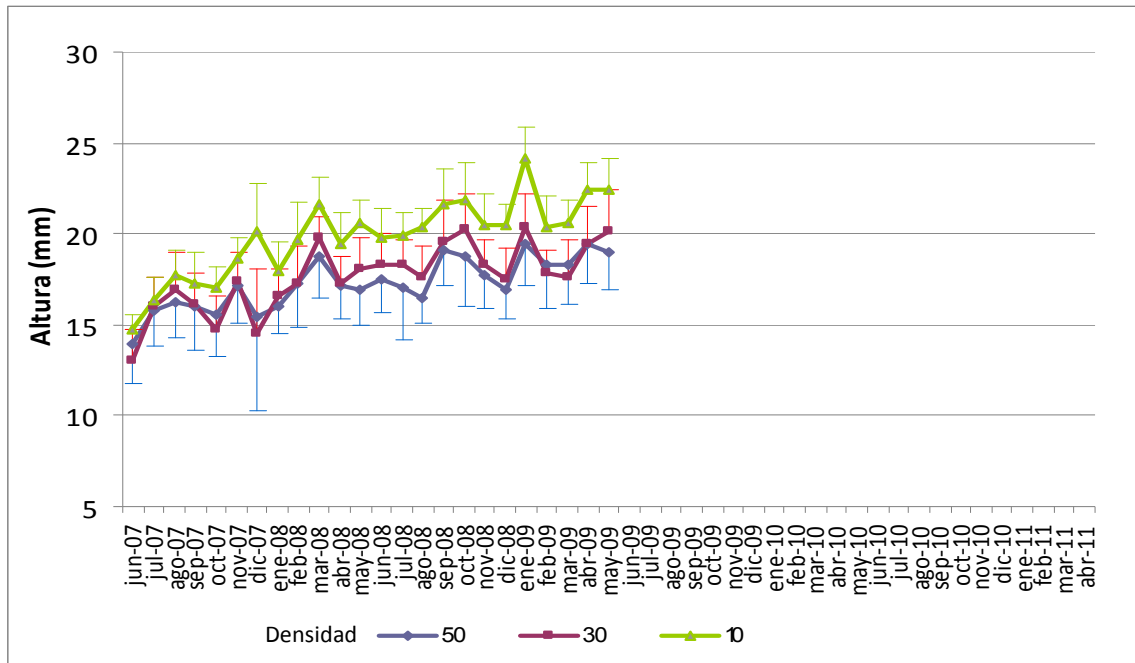


Figura 4-19.- Evolución de la altura de los erizos alimentados con pienso de mejillón con 3 densidades.

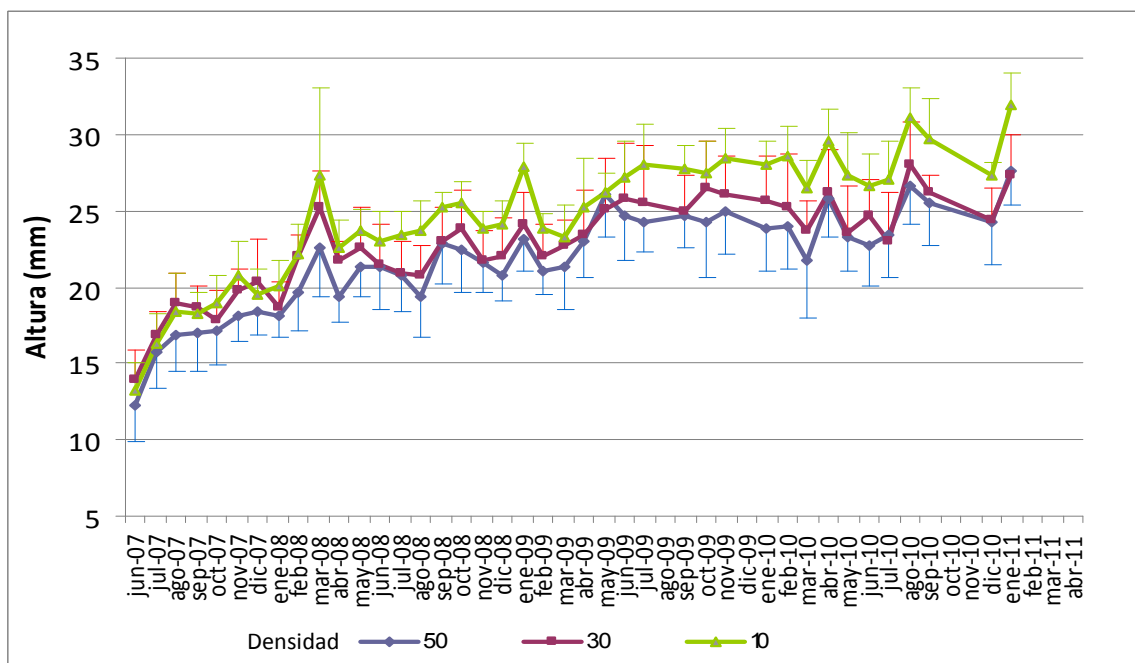


Figura 4-20.- Evolución de la altura de los erizos alimentados con Laminaria.

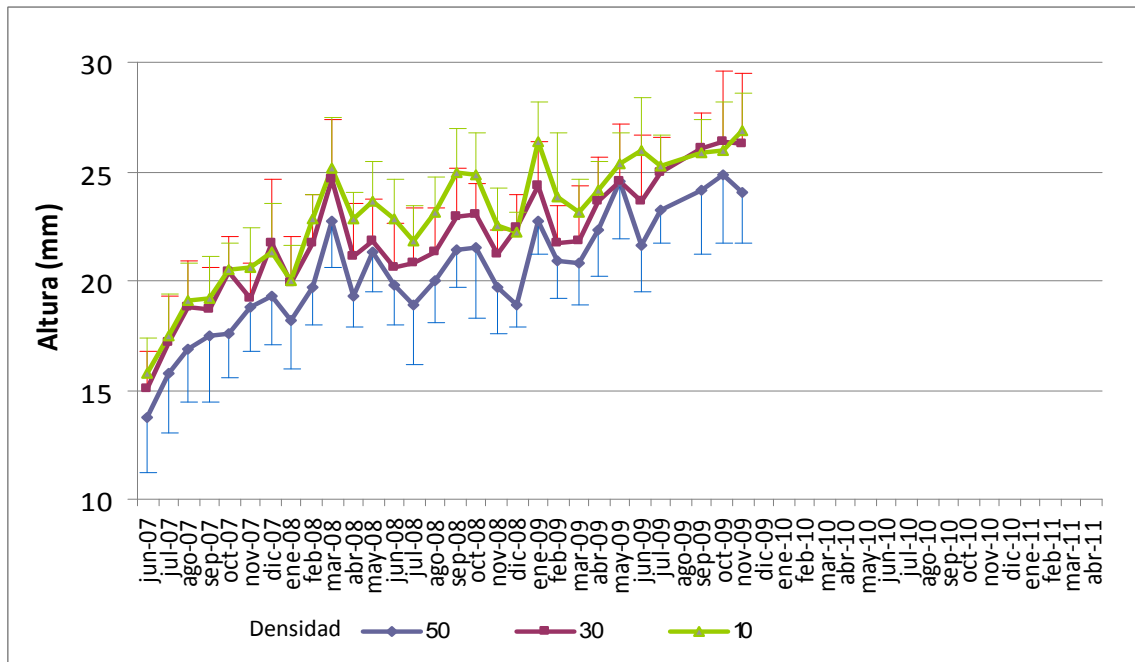


Figura 4-21.- Evolución de la altura de los erizos alimentados con Ulva con 3 densidades.

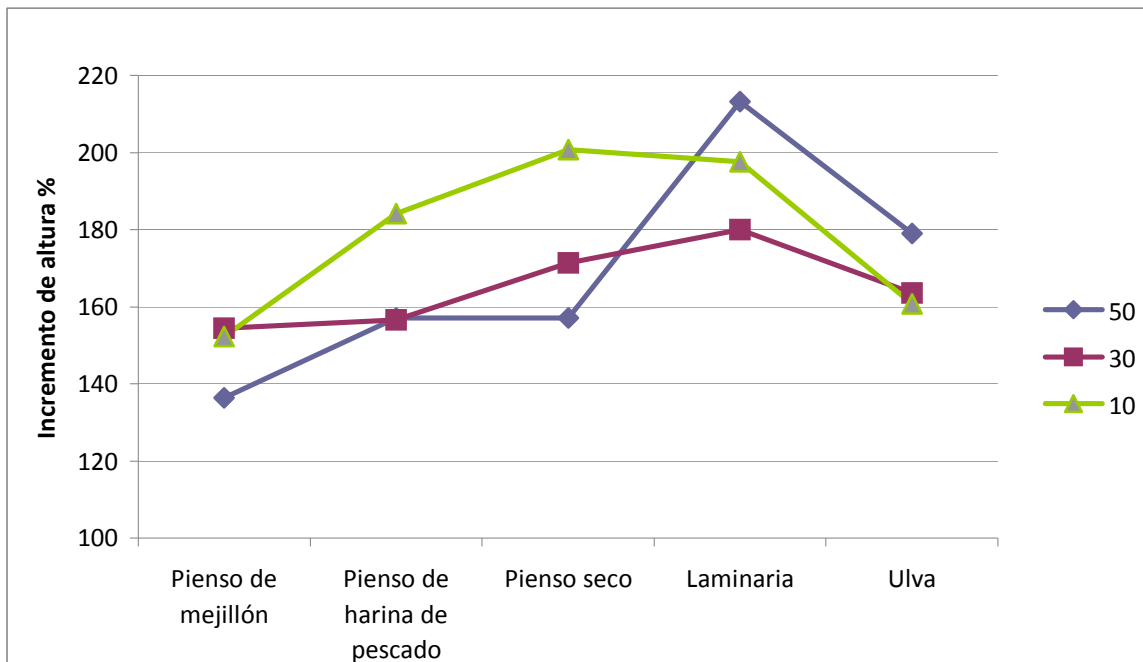


Figura 4-22.- Porcentaje de incremento de altura de los erizos con 5 dietas y 3 densidades durante los primeros 703 días de cultivo.

Como se puede observar en las gráficas, y si tenemos en cuenta los valores hasta el mes de mayo del 2009, que es la fecha hasta la que podemos comparar los cinco grupos de dietas, los mejores resultados de crecimiento se obtienen con las dietas de Laminaria y Ulva, seguidas por la dieta de pienso seco de oreja de mar, con la que se obtienen valores intermedios, y por último las dietas de pienso de mejillón y la dieta de pienso elaborado con harina de pescado. Estos resultados se hacen más patentes en el caso del diámetro (que es la medida más importante de cara al engorde ya que es la que marca el tamaño de explotación), y para la densidad más baja.

En relación al porcentaje de incremento de peso, y teniendo en cuenta que los grupos alimentados con Ulva y pienso de mejillón tienen aproximadamente dos años menos de cultivo, podemos observar que el mayor aumento de peso se produce en los individuos alimentados con Laminaria, dentro de los cuales encontramos el valor más alto de incremento (603,14%) que corresponde al grupo de densidad 10 al final del periodo de cultivo; los porcentajes más bajos de incremento de peso los encontramos en el grupo de erizos alimentados con pienso de mejillón, dentro de los cuales aparece el valor más bajo (119,32%) dentro del grupo de densidad 50, aunque este grupo y el de Ulva tienen dos años y año y medio menos de cultivo respectivamente.

Si observamos los datos relativos al incremento de diámetro, podemos ver que los mejores resultados se producen nuevamente en el grupo de erizos alimentados con Laminaria; en éste encontramos el porcentaje más elevado (104,34%) de incremento de diámetro dentro de la densidad 10. Los grupos de erizos alimentados con Pienso de harina de pescado y Pienso seco presentan valores intermedios de incremento de diámetro, seguidos por los erizos alimentados con Ulva y pienso de mejillón (34,85% en la densidad 50), pero hay que tener en cuenta que estos dos últimos grupos tienen menos tiempo de cultivo.

Los datos referentes al incremento de la altura reflejan también que el mayor porcentaje de aumento se produce dentro del grupo de individuos alimentados con Laminaria, encontrándose el valor más alto (105,86%) en el conjunto de densidad 10, a este grupo le siguen los erizos alimentados con pienso de harina de pescado, el grupo de densidad 10 alimentado con pienso seco, los grupos de erizos alimentados con Ulva y los grupos alimentados con pienso de mejillón en este orden descendente; los valores más bajos de

incremento de altura se obtienen esta vez en el grupo de erizos alimentados con pienso seco, encontrándose el valor mínimo (35,45%) en el conjunto de densidad 50. En estos datos también debemos tener en cuenta los dos años menos de cultivo en los grupos ya citados.

En el tiempo transcurrido no hubo mortalidad destacable, aunque sí aparecen menos ejemplares en algunas cestas, básicamente debido a accidentes durante el manejo o a escapes de los individuos. El efecto de la densidad, que en los primeros meses no era detectable, se va haciendo notar a medida que los individuos crecen, se puede observar un crecimiento sensiblemente mayor de los erizos estabulados en las cestas con densidad de diez individuos, aunque en el caso de los que son alimentados con *Ulva* no parece que influyan de forma notable las diferentes densidades de estabulación de los individuos en la batea sobre el crecimiento de los mismos.

Por otra parte el aumento progresivo del tamaño de los erizos aconseja hacer desdobles de las cajas de cultivo.

4.2.3.4. Análisis de los datos.

A continuación realizamos un análisis estadístico de los datos obtenidos con cada una de las variables: peso, altura y diámetro, tomando como covariables o variables factor las tres densidades y las cinco dietas de los erizos.

Éstas son las tablas que contienen la información de los estadísticos descriptivos más relevantes de las covariables (tablas 4-3, 4-4 y 4-5):

Densidad 10:

Tabla 4-3.- Estadísticos descriptivos para cada variable con la densidad 10.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	5.11	10.00	20.00
1^{er}cuartil:	18.98	18.05	36.16
Mediana:	25.60	20.38	40.10
Media:	26.20	20.39	39.82
3^{er} cuartil	32.98	22.70	44.05
Máximo:	63.80	37.26	54.21

Densidad 30:

Tabla 4-4.- Estadísticos descriptivos para cada variable con la densidad 30.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	4.56	8.45	18.58
1^{er}cuartil:	14.08	16.43	33.00
Mediana:	20.11	18.79	37.06
Media:	21.50	18.79	37.15
3^{er} cuartil	22.75	21.04	41.46
Máximo:	59.00	29.65	58.12

Densidad 50:

Tabla 4-5.- Estadísticos descriptivos para cada variable con la densidad 50.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	1.98	6.11	13.00
1^{er}cuartil:	11.51	15.16	30.38
Mediana:	17.08	17.68	35.00
Media:	18.35	17.65	34.85
3^{er} cuartil	24.05	20.05	39.35
Máximo:	48.80	30.66	54.60

Los estadísticos descriptivos más relevantes de las dietas son los siguientes (tablas 4-6, 4-7, 4-8, 4-9 y 4-10):

Harina de pescado:

Tabla 4-6.- Estadísticos descriptivos para cada variable con el pienso de harina de pescado.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	2.50	7.00	17.00
1^{er}cuartil:	11.99	15.11	30.98
Mediana:	17.70	17.49	35.54
Media:	18.14	17.38	34.92
3^{er} cuartil	23.60	19.62	39.00
Máximo:	44.00	29.65	48.76

Pienso seco:

Tabla 4-7.- Estadísticos descriptivos para cada variable con el pienso seco.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	1.98	7.00	17.00
1^{er} cuartil:	15.10	17.04	33.37
Mediana:	21.07	19.00	37.39
Media:	21.40	19.06	36.77
3^{er} cuartil	27.00	21.13	40.69
Máximo:	50.00	31.16	51.97

Pienso de mejillón:

Tabla 4-8.- Estadísticos descriptivos para cada variable con el pienso de mejillón.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	4.85	6.11	18.58
1^{er} cuartil:	12.59	15.71	31.67
Mediana:	17.34	17.54	35.28
Media:	18.90	17.65	35.63
3^{er} cuartil	24.20	19.71	39.69
Máximo:	50.00	26.55	48.62

Laminaria:

Tabla 4-9.- Estadísticos descriptivos para cada variable con Laminaria.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	2.46	8.00	13.00
1^{er} cuartil:	14.55	16.87	33.25
Mediana:	22.88	19.61	38.70
Media:	24.05	19.61	38.29
3^{er} cuartil	32.53	22.68	44.10
Máximo:	63.80	37.26	58.12

Ulva:

Tabla 4-10.- Estadísticos descriptivos para cada variable con Ulva.

	PESO(g)	ALTURA(mm)	DIAMETRO(mm)
Mínimo:	2.51	9.00	18.00
1^{er}cuartil:	16.36	17.51	34.60
Mediana:	24.25	20.28	39.38
Media:	24.65	20.00	38.88
3^{er}cuartil:	32.66	22.75	43.79
Máximo:	59.00	31.32	56.67

Como explicamos en el apartado 3.4.1. de Materiales y métodos, para analizar los datos de este experimento se consideran como variables continuas el peso, el diámetro y la altura de los erizos, las variables tipo factor son las dietas suministradas. El objetivo de este análisis estadístico es averiguar si las variables continuas son independientes o no de las variables factor, es decir, si las dietas y las diferentes densidades de cultivo influyen significativamente en el crecimiento de los erizos.

Para realizar un análisis de la varianza (ANOVA) que nos permitiría comprobar la independencia de las variables continuas y las variables factor, los datos obtenidos deben cumplir los supuestos de **normalidad**, **homocedasticidad** e **independencia** de las observaciones (Cobo, 2007); de ellos el supuesto de normalidad es fundamental para que el ANOVA sea fiable. Al realizar las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, que nos permiten saber si los datos cumplen o no el supuesto de normalidad, comprobamos que los datos de las variables continuas no cumplen este supuesto, por lo tanto tenemos que realizar un contraste de hipótesis empleando el test de Kruskal-Wallis para analizar los datos; este test es la alternativa no paramétrica al ANOVA, el único requisito necesario es la aleatoriedad en la obtención de los datos y ésta queda garantizada por el diseño del experimento. Los análisis se realizan para cada una de las densidades.

a. Tratamiento estadístico. Densidad 10.

Variable peso:

Empezamos realizando un contraste de medias para la variable ‘peso’ (tabla 4-11), obteniendo los siguientes intervalos de confianza:

Tabla 4-11.- Contraste de medias para la variable continua ‘peso’.

PESO	Peso medio	I.C. para el peso medio al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	21,97	20,96	22,97
Laminaria	29,44	27,37	31,51
Pienso de mejillón	25,74	24,75	26,74
Pienso seco	23,97	22,72	25,22
Ulva	31,25	30,04	32,45

La estimación puntual de las medias de la variable ‘peso’ en cada grupo (21,97; 29,44; 25,74; 23,97; 31,25) y sus intervalos de confianza (20,96 – 22,97 en el grupo Harina de pescado; 27,37 – 31,51 en el grupo Laminaria; 24,75 – 26,74 en el grupo Pienso de mejillón; 22,72 – 25,22 en el grupo Pienso seco y 30,04 – 32,45 en el grupo Ulva) son superponibles en los siguientes grupos: Harina de pescado y Pienso seco, Pienso de mejillón y Pienso seco, Laminaria y Ulva, por lo que la probabilidad de que esta variable esté relacionada con el factor ‘dieta’ no es muy elevada. Como las variables continuas no cumplen los supuestos de normalidad realizamos un test no paramétrico de Kruskal-Wallis (tabla 4-12).

Tabla 4-12.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable peso y la densidad 10.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	123.2547
Grados de libertad	4
p-valor	< 2.2e-16

El p -valor es $< 2,2e-16 < 0,05$, esto significa que tenemos pruebas para rechazar la hipótesis nula H_0 , es decir, la igualdad de las medias. La media de la variable peso

cambia dependiendo de las dietas con las que alimentamos a los erizos, por lo tanto podemos relacionar el peso con los cinco tipos de dieta analizados. Sin embargo, esto no significa que las medias de las dietas sean iguales entre sí, para averiguarlo se hicieron comparaciones entre los pares de dietas cuyos intervalos de confianza intersecan entre sí.

Para comprobar la igualdad o no de las medias de los pares de dietas cuyos intervalos intersecan se realizó en primer lugar un test (contraste de homocedasticidad) para verificar que sus varianzas son distintas, posteriormente se llevó a cabo un contraste de hipótesis en el que H_0 significa que las medias para ambas dietas son iguales y H_1 que son distintas.

Harina de pescado y Pienso seco:

En los resultados del contraste de homocedasticidad o contraste de varianza, el intervalo de confianza no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (0,50; 0,85). Después de realizar el contraste de hipótesis obtuvimos un valor del estadístico de contraste ($t = -2,4588$), de los grados de libertad ($df = 443,834$), y del p -valor ($p\text{-value} = 20,01432$). Dado que es superior a 0,05, ya podemos concluir que tenemos evidencias en los datos para afirmar con un 95 % de confianza que las medias de ambas dietas son iguales, es decir, influyen en la misma medida en el crecimiento de los erizos, es indiferente con cuál de estas dietas los alimentemos, obtendremos resultados análogos de aumento de peso.

Pienso seco y Pienso de mejillón:

En este caso el intervalo de confianza obtenido en el contraste de homocedasticidad tampoco contiene al 1 (0,51; 0,85), las varianzas son distintas. Los resultados obtenidos en el contraste de hipótesis son: valor del estadístico de contraste ($t = 2,1907$), los grados de libertad ($df = 444,881$), y el p -valor ($p\text{-value} = 0,02899$). El p -valor es inferior a 0,05, por lo que podemos afirmar que las medias de las dietas son distintas. En este caso se obtienen mayores aumentos de peso en los erizos alimentados con Pienso de mejillón.

Laminaria y Ulva:

En los resultados del contraste de homocedasticidad, el intervalo de confianza no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (1,46; 2,64). Realizamos un contraste de hipótesis en el que se obtuvieron valores del estadístico de contraste ($t = -1,4901$), de los grados de libertad ($df = 248,36$), y del p -valor ($p\text{-value} = 0,1375$). Como el p -valor es superior a 0,05, en este caso las medias de las dietas también son iguales.

En la tabla 4-11 podemos observar que la dieta con la que se obtienen erizos más pesados es la dieta a base de Ulva, seguida por la dieta de Laminaria; la dieta con la que obtenemos erizos con un peso más bajo es la de Harina de pescado. Con las dietas basadas en Pienso de mejillón y Pienso seco se obtienen erizos con un peso intermedio.

Variable altura:

A continuación se muestra el contraste de medias obtenido con la variable ‘altura’ (tabla 4-13).

Tabla 4-13.- Contraste de medias para la variable continua ‘altura’.

ALTURA	Altura media	I.C. para la altura media al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	18,80	18,41	19,20
Laminaria	21,43	20,75	22,11
Pienso de mejillón	19,81	19,48	20,14
Pienso seco	20,06	19,57	20,55
Ulva	22,33	21,93	22,73

La estimación puntual de la media de la variable ‘altura’ en los grupos alimentados con algas (Laminaria y Ulva) así como sus intervalos de confianza (20,75-22,11 para Laminaria y 21,93-22,73 para Ulva) son muy superponibles. Lo mismo ocurre con los intervalos de confianza de las dietas Pienso de mejillón (19,48-20,14) y Pienso seco (19,57-20,55). Sin embargo, para el grupo de erizos alimentados con Harina de pescado, sí se observan diferencias en su media (18,80) y en su intervalo de confianza (18,41-19,20) con respecto a los demás, por lo que tenemos indicios para pensar que en este

caso la variable ‘altura’ y la ‘dieta’ sí están relacionadas dentro de la población. Para averiguarlo realizamos un test de Kruskal-Wallis (tabla 4-14):

Tabla 4-14.- Resultado del contraste de hipótesis para la variable altura y la densidad 10.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	148.4873
Grados de libertad	4
<i>p</i>-valor	< 2.2e-16

El *p*-valor es $< 2,2e-16 < 0,05$, tenemos pruebas para rechazar la igualdad de medias en la altura de la población de donde proviene la muestra (hipótesis nula), la altura está relacionada con los 5 tipos de dieta. Para comprobar la igualdad de las medias de las dietas cuyos intervalos de confianza se superponen realizamos los siguientes contrastes de hipótesis:

Pienso seco y Pienso de mejillón:

En los resultados del contraste de homocedasticidad, el intervalo de confianza no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (0,36; 0,61). El resultado del contraste de hipótesis realizado es el siguiente: valor del estadístico de contraste ($t = -0,829$), los grados de libertad ($df = 408,545$), y el *p*-valor ($p\text{-value} = 0,4076$). Al ser el *p*-valor superior a 0,05, concluimos con un 95 % de confianza que las medias de ambas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

Una vez realizado el contraste de homocedasticidad obtenemos un intervalo de confianza que no contiene al 1, las varianzas son distintas (1,45; 2,61). El valor del estadístico de contraste ($t = - 2,2563$), los grados de libertad ($df = 249,308$), y el *p*-valor ($p\text{-value} = 0,02492$). En este caso el *p*-valor es inferior a 0,05, por lo que podemos afirmar que las medias de estas dietas son distintas.

Con la variable altura obtenemos resultados análogos a los obtenidos con el peso. Los erizos de mayor peso son los alimentados con las dietas de Ulva y Laminaria, los menos

pesados son los alimentados con la dieta de Harina de pescado y las dietas de Pienso de mejillón y Pienso seco producen erizos con un peso intermedio.

Variable diámetro:

Tabla 4-15.- Contraste de medias para la variable continua ‘diámetro’.

DIÁMETRO	Diámetro medio	I.C. para el diámetro medio al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	37,32	36,66	37,99
Laminaria	40,93	39,81	42,06
Pienso de mejillón	40,50	39,92	41,08
Pienso seco	38,05	37,32	38,78
Ulva	42,78	42,09	43,46

La tabla 4-15 nos muestra una superponibilidad entre los intervalos de confianza de los piensos de Harina de pescado (36,66-37,99) y Pienso seco (37,32-38,78). Los intervalos de confianza de los grupos Laminaria y Pienso de mejillón también intersecan entre sí (39,81-42,06 y 39,92-41,08) respectivamente, de esto deducimos que es improbable que las variables ‘diámetro’ y ‘dieta’ estén relacionadas en la población. Realizamos contrastes de hipótesis dos a dos para comprobar si las medias de las dietas cuyos intervalos de confianza intersecan son iguales o distintas.

Harina de pescado y Pienso seco:

El primer contraste de hipótesis se lleva a cabo con las dietas de Harina de pescado y Pienso seco, la hipótesis nula H_0 significa que las medias de estas dietas son iguales, H_1 significa que son distintas. En primer lugar hemos de verificar que las varianzas son distintas, para lo cual realizamos un contraste de varianza cuyo resultado es que las varianzas son diferentes ya que el intervalo de confianza resultante no contiene al 1 (1,35; 2,43). Una vez hecho el contraste de hipótesis obtenemos un valor del estadístico de contraste ($t = -1,4463$), los grados de libertad ($df = 460,448$) y el p -valor = 0,1488; como el p -valor es $> 0,05$ concluimos que las medias de ambas dietas son iguales.

Laminaria y Pienso de mejillón:

Realizamos el mismo procedimiento para comparar las medias de las dietas Laminaria y Pienso de mejillón, obteniendo como resultado del contraste de homocedasticidad que las varianzas de ambas dietas son distintas, el intervalo de confianza no contiene al 1 (1,77; 3,16). Del contraste de hipótesis se obtuvieron los siguientes resultados: valor del estadístico de contraste ($t = 8,52$), los grados de libertad ($df = 2100,91$) y el p -valor = $2,2e-16$. En este caso también podemos decir con un 95% de confianza que las medias de estas dietas son distintas.

Realizamos el test de Kruskal-Wallis (tabla 4-16) para comprobar si la variable ‘diámetro’ es independiente o no de las dietas con las que alimentamos a los erizos.

Tabla 4-16.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable diámetro y la densidad 10.

	Dietas
Estadístico Chi-cuadrado	141.227
Grados de libertad	4
p -valor	$< 2.2e-16$

Observando en la tabla los resultados obtenidos en el test de Kruskal-Wallis podemos afirmar que se rechaza la hipótesis nula (p -valor $< 2,2e-16 < 0,05$), por lo tanto la media de las dietas es distinta, tenemos razones para pensar que el diámetro de los erizos está relacionado con los tipos de dieta con los que son alimentados.

Una vez más los mejores resultados en cuanto a diámetro de los erizos se obtienen con la dieta de Ulva y los erizos de menor diámetro son los alimentados con Harina de pescado. Con el resto de las dietas obtenemos valores de diámetro intermedios.

b. Tratamiento estadístico. Densidad 30.

Variable peso:

En la tabla 4-17 podemos ver el resultado del contraste de medias realizado para la variable ‘peso’ dentro del grupo de densidad 30.

Tabla 4-17.- Contraste de medias para la variable continua ‘peso’.

PESO	Peso medio	I.C. para el peso medio al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	17,48	16,70	18,27
Laminaria	25,61	24,45	26,77
Pienso de mejillón	17,32	16,54	18,10
Pienso seco	21,71	20,80	22,61
Ulva	25,40	24,28	26,53

Los intervalos de confianza de las dietas Harina de pescado y Pienso de mejillón sí intersecan, también lo hacen los I.C. de las dietas Laminaria y Ulva; es improbable que en estos dos casos las variables ‘peso’ y ‘dieta’ estén relacionadas en la población. La dieta de Pienso seco presenta una estimación puntual de la media y un intervalo de confianza bien diferenciado, lo que nos induce a pensar que en este caso las variables ‘peso’ y ‘dieta’ sí están relacionadas.

Tabla 4-18.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable peso y la densidad 30.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	212.0478
Grados de libertad	4
p-valor	< 2.2e-16

A la vista de los resultados del test de Kruskal-Wallis rechazamos la hipótesis nula y por tanto la igualdad de medias de las dietas. Esto no significa que sean todas distintas.

La dieta de Laminaria es la más eficaz para obtener erizos de mayor peso, seguida por la dieta de Ulva. La dieta de Pienso de mejillón es en este caso la que peor funciona.

Harina de pescado y Pienso de mejillón:

En el caso de las dietas de Harina de pescado y Pienso de mejillón planteamos un contraste de hipótesis para verificar la igualdad de sus medias. El resultado que obtenemos al realizar el contraste de varianzas previo es que las varianzas correspondientes a cada una de las dietas son iguales (0,80; 1,27). Una vez realizado el contraste de hipótesis obtenemos los siguientes valores del estadístico de contraste $t = 0,2974$, los grados de libertad ($df = 597,976$) y el p -valor = 0,7662. El p -valor es superior a 0,05, por lo que podemos afirmar con un 95 % de confianza que las medias de ambas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

Para comparar estas dietas entre sí realizamos un contraste de homocedasticidad, cuyo resultado es que las varianzas son distintas (1,46; 2,64), el intervalo de confianza no contiene al uno. Los valores obtenidos en el contraste de hipótesis son: estadístico de contraste $t = 0,2523$, los grados de libertad ($df = 597,437$) y el p -valor = 0,8009. El p -valor es superior a 0,05, lo cual significa que las medias de ambas dietas son iguales.

Variable altura:

Tabla 4-19.- Contraste de medias para la variable continua ‘altura’.

ALTURA	Altura media	I.C. para la altura media al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	17,12	16,80	17,45
Laminaria	20,24	19,82	20,66
Pienso de mejillón	17,17	16,86	17,47
Pienso seco	19,08	18,73	19,43
Ulva	20,34	19,96	20,73

En la tabla 4-19 podemos ver que, como en el caso del peso, los intervalos de confianza que intersecan son los correspondientes a las dietas de Harina de pescado (16,80-17,45) con Pienso de mejillón (16,86-17,47) y Laminaria (19,82-20,66) con Ulva (19,96-20,73). Comprobamos la igualdad de las medias de estas dietas entre sí mediante un contraste de hipótesis.

Harina de pescado y Pienso de mejillón:

El resultado del contraste de homocedasticidad es que las varianzas de ambas dietas son iguales (0,90; 1,42), el intervalo de confianza obtenido contiene al uno. Al realizar el contraste de hipótesis obtuvimos los siguientes valores: estadístico de contraste $t = -0,1908$, los grados de libertad ($df = 595,5$) y el p -valor = 0,8487. El p -valor es superior a 0,05, podemos afirmar con un 95% de confianza que las medias de estas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

El intervalo de confianza resultante del contraste de homocedasticidad en este caso también contiene al uno (0,96; 1,51), las varianzas son iguales. Realizamos un contraste de hipótesis para comprobar si las medias de ambas dietas son iguales entre sí (H_0). Los valores obtenidos son: estadístico de contraste $t = -0,3524$, los grados de libertad ($df = 592,643$) y el p -valor = 0,7246. El p -valor es $> 0,05$, por lo tanto las medias de estas dietas son iguales.

En este caso al realizar las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para comprobar si los datos cumplen los supuestos de normalidad, obtenemos un resultado significativo para todos los grupos en ambas pruebas, por lo tanto podemos asumir que los datos son normales. Realizamos un ANOVA para evaluar hasta qué punto las medias de la variable altura para cada dieta son diferentes. En la tabla 4-20 el p -valor es $< 2,2e-16 < 0,05$, por lo tanto podemos rechazar la igualdad de las medias y afirmar con un 95% de confianza que la variable 'altura' está relacionada con los 5 tipos de dieta analizados.

Tabla 4-20.- Resultado del ANOVA para la variable altura y la densidad 30.

Análisis de la varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F de Snedecor	p-valor
Entre grupos	4	3003.1	750.77	74.489	<2.2e-16 ***
Dentro grupos	1494	15058.1	10.08		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

De la tabla 4-20 puede concluirse que tenemos pruebas para rechazar la hipótesis nula, es decir, rechazamos la igualdad de medias en la población de la que proviene la muestra y concluimos que hay argumentos que relacionan la altura con los 5 tipos de dieta analizados.

En el caso de la variable 'altura' se obtienen resultados análogos a los obtenidos para esta variable en la densidad 10. La dieta con la que se obtienen erizos más pesados es Ulva; la dieta con la que obtenemos erizos de menor peso es la de Pienso de harina de pescado y con las otras tres dietas los erizos presentan una altura intermedia.

Variable diámetro:

Tabla 4-21.- Contraste de medias para la variable continua 'diámetro'.

DIÁMETRO	Diámetro medio	I.C. para el diámetro medio al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	34,74	34,17	35,32
Laminaria	39,76	39,06	40,46
Pienso de mejillón	34,52	33,95	35,10
Pienso seco	37,17	36,56	37,79
Ulva	39,55	38,85	40,24

La tabla 4-21 nos muestra que en el caso del Pienso seco tanto la estimación puntual de la media como su intervalo de confianza aparecen bien diferenciados; no ocurre lo mismo con las dietas de Harina de pescado (34,17-35,32) y Pienso de mejillón (33,95-35,10), y las dietas de Laminaria (39,06-40,46) y Ulva (38,85-40,24) cuyos intervalos de confianza intersecan ligeramente.

Tabla 4-22.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable diámetro y la densidad 30.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	206.2586
Grados de libertad	4
<i>p</i> -valor	< 2.2e-16

El resultado del test de Kruskal-Wallis niega la hipótesis nula (igualdad de medias) debido a lo que podemos afirmar que el diámetro está relacionado con los 5 tipos de dieta analizados. Análogamente a los datos de peso, la dieta de Laminaria es la más eficaz para obtener erizos más pesados y la dieta de Pienso de mejillón la menos eficaz en este caso. La dieta de Pienso seco produce erizos con un diámetro intermedio y es diferente de las otras cuatro, su intervalo de confianza no interseca ni contiene a ninguno.

Harina de pescado y Pienso de mejillón:

En el caso de las dietas de Harina de pescado y Pienso de mejillón sus intervalos de confianza sí intersecan, planteamos un contraste de hipótesis para verificar la igualdad (H_0) de sus medias. Realizamos previamente el contraste de varianzas que da como resultado que éstas son iguales: (0,81; 1,27). Los resultados del contraste de hipótesis son: valor del estadístico de contraste ($t = 0,5295$); grados de libertad ($df = 597,959$) y el p -valor = 0,5967. Dado que es superior a 0,05, podemos concluir que tenemos evidencias en los datos para afirmar con un 95 % de confianza que las medias de ambas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

Al realizar el contraste de varianzas el intervalo de confianza obtenido contiene al 1: (0,80; 1,26), por tanto las varianzas son iguales. El valor del estadístico de contraste ($t = 0,4203$), los grados de libertad ($df = 597,981$), y el p -valor = 0,6744. Como es superior a 0,05, podemos afirmar que las medias de las dietas son iguales.

c. Tratamiento estadístico. Densidad 50.

Variable peso:

Tabla 4-23.- Contraste de medias para la variable continua ‘peso’.

PESO	Peso medio	I.C. para el peso medio al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	16,19	15,38	16,99
Laminaria	20,51	19,37	21,65
Pienso de mejillón	15,65	14,99	16,31
Pienso seco	19,49	18,70	20,27
Ulva	19,90	18,93	20,88

Vemos que los intervalos de confianza del grupo Harina de pescado (15,38-16,99) y del grupo Pienso de mejillón (14,99-16,31) intersecan entre sí; lo mismo ocurre entre los intervalos de confianza de los grupos Laminaria (19,37-21,65), Pienso seco (18,70-20,27) y Ulva (18,93-20,88). Esto significa que es poco probable que las variables ‘peso’ y ‘dieta’ estén relacionadas en la población en este caso. Para comprobarlo realizamos un test de Kruskal-Wallis (tabla 4-24).

Tabla 4-24.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable peso y la densidad 50.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	82.9841
Grados de libertad	4
p-valor	< 2.2e-16

Tenemos argumentos para rechazar la hipótesis nula (p -valor < 0,05), las medias del peso son distintas para las cinco dietas, las dos variables, ‘peso’ y ‘dieta’ están relacionadas en la población de la que provienen las muestras. La dieta de Laminaria es la que mejor funciona incrementando el peso de los erizos y la menos eficaz es la dieta de Pienso de mejillón. Con las 3 dietas restantes se obtienen valores de peso intermedios. Nuevamente realizamos un contraste de varianzas y un contraste de hipótesis entre pares de dietas para comprobar la igualdad de las medias de la variable ‘peso’ obtenidas con las dietas cuyos intervalos de confianza se superponen entre sí.

Harina de pescado y Pienso de mejillón:

En el contraste de homocedasticidad obtenemos un intervalo de confianza que no contiene al uno (1,21; 1,83), podemos decir que las varianzas son distintas. Los resultados que obtenemos en el contraste de hipótesis son: valor del estadístico de contraste $t = 1,0176$, los grados de libertad ($df = 692,506$) y el p -valor = 0,3092. El p -valor es superior a 0,05, por tanto las medias de ambas dietas son iguales.

Pienso seco y Ulva:

En los resultados del contraste de homocedasticidad el intervalo de confianza no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (0,52; 0,79). El valor del estadístico de contraste ($t = -0,6522$), los grados de libertad ($df = 686,805$), y el p -valor = 0,5145. Dado que es superior a 0,05, podemos concluir que las medias de ambas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

El intervalo de confianza obtenido en el contraste de homocedasticidad no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (1,10; 1,66). El valor del estadístico de contraste que obtenemos al realizar el contraste de hipótesis es ($t = 0,7971$), los grados de libertad ($df = 702,423$), y el p -valor = 0,4257. El p -valor es superior a 0,05, podemos afirmar que las medias de estas dietas son iguales.

Pienso seco y Laminaria:

En el contraste de homocedasticidad realizado obtenemos un intervalo de confianza que no contiene al uno (1,71; 2,79), por tanto las varianzas son distintas. Los resultados del contraste de hipótesis son: valor del estadístico de contraste $t = 1,4552$, los grados de libertad ($df = 637,162$) y el p -valor = 0,1461. El p -valor es superior a 0,05, concluimos entonces que las medias de ambas dietas son iguales.

Variable altura:

Tabla 4-25.- Contraste de medias para la variable continua 'altura'.

ALTURA	Altura media	I.C. para la altura media al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	16,67	16,31	17,03
Laminaria	18,33	17,89	18,76
Pienso de mejillón	16,62	16,34	16,89
Pienso seco	18,39	18,03	18,75
Ulva	18,28	17,90	18,65

Los intervalos de confianza que intersecan entre sí son los correspondientes a las dietas: Harina de pescado (16,31-17,03) y Pienso de mejillón (16,34-16,89); Pienso seco (18,03-18,75) y Ulva (17,90-18,65); Pienso seco (18,03-18,75) y Laminaria (17,89-18,76); Laminaria y Ulva, por lo que se realiza un contraste de hipótesis para comprobar si las alturas medias de estos pares de dietas son estadísticamente iguales.

Observando los resultados obtenidos en el test de Kruskal-Wallis (tabla 4-26) rechazamos la hipótesis nula de igualdad de medias debido a que el p -valor es menor que 0,05, podemos afirmar con un 95% de confianza que la variable altura está relacionada con los 5 tipos de dieta analizados. Esto no significa que todas las dietas sean distintas entre ellas, para comprobarlo se hicieron comparaciones entre los pares de dietas cuyos intervalos de confianza intersecan.

Tabla 4-26.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable altura y la densidad 50.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	110.0401
Grados de libertad	4
p -valor	< 2.2e-16

Harina de pescado y Pienso de mejillón:

El intervalo de confianza resultante al realizar el contraste de homocedasticidad no contiene al 1 (1,38; 2,01), las varianzas son distintas. El resultado del contraste de hipótesis realizado para estas dietas es el siguiente: valor del estadístico de contraste $t = 0,2146$, los grados de libertad ($df = 674,546$) y el p -valor = 0,8302. Las medias correspondientes a estas dietas son estadísticamente iguales con un 95% de confianza.

Laminaria y Pienso seco:

En los resultados del contraste de homocedasticidad, el intervalo de confianza no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (1,20; 1,81). El valor del estadístico de contraste ($t = -0,2488$), los grados de libertad ($df = 691,666$), y el p -valor = 0,8036. Dado que es superior a 0,05, ya podemos concluir que tenemos evidencias en los datos para afirmar con un 95 % de confianza que la media de ambas dietas son iguales.

Ulva y Pienso seco:

El intervalo de confianza obtenido al realizar el contraste de homocedasticidad contiene al 1, por tanto las varianzas son iguales (0,77; 1,11). En el contraste de hipótesis se obtuvieron los siguientes datos: valor del estadístico de contraste ($t = 0,4543$), los grados de libertad ($df = 715,718$), y el p -valor = 0,6498. El p -valor es superior a 0,05, por lo que podemos afirmar que las medias de estas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

Al realizar el contraste de homocedasticidad obtenemos un intervalo de confianza que no contiene al 1: (1,08; 1,64), podemos decir que las varianzas son distintas. Como resultado del contraste de hipótesis se obtuvieron los siguientes valores: estadístico de contraste ($t = 0,1665$), los grados de libertad ($df = 703,887$), y el p -valor = 0,8678. El p -valor es $> 0,05$, por tanto tenemos evidencias en los datos para afirmar que las medias de ambas dietas son iguales.

Análogamente a los resultados anteriores, la dieta con la que se consigue una mayor altura de los erizos es la dieta de Laminaria, los datos más bajos de altura los presentan los erizos alimentados con Pienso de mejillón y con las demás dietas se obtienen valores de altura intermedios.

Variable diámetro:

En la tabla 4-27 podemos ver el resultado del contraste de medias para la variable ‘diámetro’ y el grupo de densidad 50.

Tabla 4-27.- Contraste de medias para la variable continua ‘diámetro’.

DIÁMETRO	Diámetro medio	I.C. para el diámetro medio al 95%	
		Lim. Inferior	Lim. Superior
Harina de pescado	33,49	32,89	34,09
Laminaria	35,98	35,17	36,78
Pienso de mejillón	33,30	32,81	33,79
Pienso seco	35,60	35,03	36,17
Ulva	35,89	35,19	36,59

En este caso los intervalos de confianza que intersecan son los correspondientes a las dietas de Harina de pescado (32,89-34,09) y Pienso de mejillón (32,81-33,79); Laminaria (35,17-36,78) y Pienso seco (35,03-36,17); Ulva (35,19-36,59) y Pienso seco (35,03-36,17); Laminaria y Ulva. Comprobamos si las medias de estas dietas son iguales o no entre sí.

Harina de pescado y Pienso de mejillón:

El intervalo de confianza obtenido en el contraste de homocedasticidad no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (1,25; 1,89). Los resultados obtenidos al realizar el contraste de hipótesis son: valor del estadístico de contraste ($t = 0,4869$), los grados de libertad ($df = 688,169$), y el p -valor = 0,6265. El p -valor es $>0,05$, las medias de ambas dietas son iguales.

Ulva y Pienso seco:

Realizamos un contraste de homocedasticidad en el que obtenemos que las varianzas de ambas dietas son distintas ya que el intervalo de confianza resultante no contiene al 1 (0,53; 0,81). En el correspondiente contraste de hipótesis obtenemos unos valores del estadístico de contraste $t = -0,6239$, los grados de libertad ($df = 690,777$) y el p -valor = $0,5329 > 0,05$. Las medias de ambas dietas son iguales con un 95% de confianza.

Laminaria y Pienso seco:

El intervalo de confianza obtenido al realizar el contraste de homocedasticidad no contiene al 1: (1,61; 2,44), las varianzas son distintas. Los resultados obtenidos en el contraste de hipótesis son los siguientes: valor del estadístico de contraste ($t = 0,7458$), los grados de libertad ($df = 647,309$), y el p -valor = $0,4561$. El p -valor es $> 0,05$, por lo tanto podemos decir que las medias de estas dietas son iguales.

Laminaria y Ulva:

En los resultados del contraste de homocedasticidad, el intervalo de confianza no contiene al 1 por tanto las varianzas son distintas (1,07; 1,62). Al realizar el contraste de hipótesis obtenemos los siguientes valores: estadístico de contraste ($t = 0,1616$), los grados de libertad ($df = 705,182$), y el p -valor = $0,8716$. Como es superior a $0,05$, podemos afirmar que las medias de las dietas son iguales.

Como los datos no cumplen los supuestos de normalidad, realizamos una prueba no paramétrica (test de Kruskal-Wallis) para comprobar si la variable 'diámetro' está o no relacionada con las dietas (tabla 4-28).

Tabla 4-28.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para la variable diámetro y la densidad 50.

	Dietas
Estadístico Chi-cuadrado	78.0527
Grados de libertad	4
p -valor	4.502e-16

Los resultados obtenidos en el test de Kruskal-Wallis (p -valor $< 0,05$) nos permiten rechazar la hipótesis nula, podemos decir que la variable ‘diámetro’ está relacionada con los 5 tipos de dieta analizados con un 95% de confianza.

Como ocurría con las otras variables analizadas (‘peso’ y ‘altura’), los erizos de mayor diámetro se obtienen alimentándolos con la dieta de Laminaria, mientras que el diámetro más pequeño se corresponde con los erizos alimentados con la dieta de Pienso de mejillón. Los erizos alimentados con las dietas restantes presentan valores intermedios de diámetro.

Los resultados del análisis estadístico confirman las tendencias observadas en las representaciones gráficas de los datos, además nos permite concluir que las cinco dietas que fueron suministradas a los erizos influyeron en su crecimiento significativamente. Las medias de las dietas de Ulva y Laminaria, así como las medias de Harina de pescado y Pienso de mejillón son estadísticamente iguales entre sí, pueden usarse una u otra indistintamente para la alimentación de los erizos, ya que se obtendrán resultados de crecimiento similares.

La alimentación más eficaz para conseguir un crecimiento de los erizos a todos los niveles (peso, diámetro y altura) es una dieta basada en algas (Ulva y Laminaria), a su vez las que peor funcionan son las dietas de Harina de pescado y Pienso de mejillón. La dieta basada en Pienso seco produce erizos con un tamaño intermedio.

Análisis de la influencia de la densidad en el crecimiento.

En este apartado del análisis estadístico se tienen en cuenta los datos de crecimiento de los erizos hasta el final del experimento con cada dieta, con el fin de comprobar si las diferentes densidades de cultivo influyen significativamente en el crecimiento de los mismos. En este caso los datos de la variable ‘altura’ cumplen los supuestos de normalidad, por lo que se analizarán mediante un ANOVA.

Pienso de harina de pescado:

Como podemos ver en la tabla 4-29, a medida que aumentamos la densidad, las medias de peso y diámetro de los erizos alimentados con el pienso de harina de pescado disminuyen significativamente.

Tabla 4-29.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para las variables peso y diámetro.

Variable	Densidad (N° de individuos/cesta)			Estadístico χ^2	Valor- <i>P</i>
	10	30	50		
Peso	28,01 ± 0,50	21,95 ± 0,45	19,87 ± 0,42	135,16	<0,001
Diámetro	40,64 ± 0,32	37,64 ± 0,29	35,93 ± 0,27	120,88	<0,001

Tabla 4-30.- Resultado del ANOVA para la variable altura.

Fuente	Suma cuadr.	Grados libertad	Media cuadr.	F-Ratio	<i>P</i> -valor
Entre grupos	1902,64	2	951,318	71,32	0,0000
Dentro grupos	18420,6	1381	13,3386		
Total (Corr.)	20323,2	1383			

En el caso de la variable altura también se encuentran diferencias significativas entre las tres densidades de cultivo.

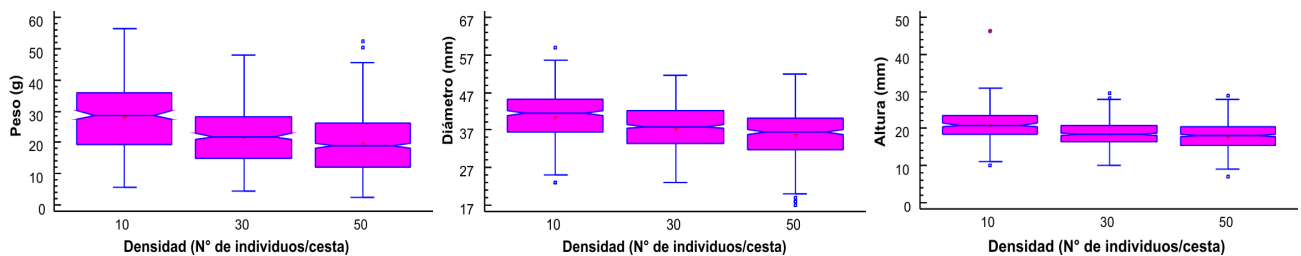


Figura 4-23.- Representación gráfica de las medias obtenidas con las 3 densidades para cada variable.

Laminaria:

En el caso del grupo de erizos alimentados con Laminaria también se observan diferencias significativas entre las tres densidades de cultivo para las variables peso y diámetro (tabla 4-31).

Tabla 4-31.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para las variables peso y diámetro.

Variable	Densidad (N° de individuos/cesta)			Estadístico χ^2	Valor- <i>P</i>
	10	30	50		
Peso	39,11 ± 1,02	32,64 ± 0,70	27,17 ± 0,66	73,98	<0,001
Diámetro	45,27 ± 0,56	43,23 ± 0,38	39,86 ± 0,36	60,74	<0,001

El resultado del ANOVA para la variable altura (tabla 4-32) confirma que las medias de las 3 densidades de cultivo son significativamente distintas, se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias ya que el *p*-valor<0,05.

Tabla 4-32.- Resultado del ANOVA para la variable altura.

Fuente	Suma cuadr.	Grados libertad	Media cuadr.	F-Ratio	<i>P</i> -valor
Entre grupos	1918,44	2	959,22	45,18	0,0000
Dentro grupos	25798,1	1215	21,233		
Total (Corr.)	27716,6	1217			

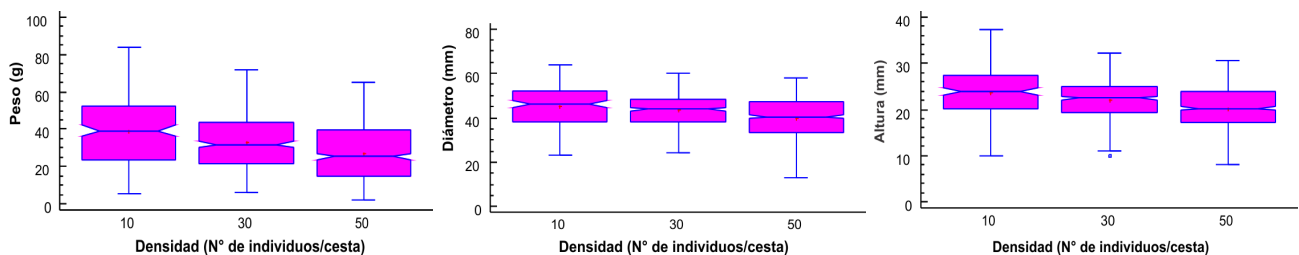


Figura 4-24.- Representación gráfica de las medias obtenidas con las 3 densidades para cada variable.

Pienso de mejillón:

Como podemos ver en las tablas 4-33 y 4-34, en ambos análisis los resultados obtenidos son diferencias significativas en las medias de las densidades de cultivo para cada variable.

Tabla 4-33.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para las variables peso y diámetro.

Variable	Densidad (N° de individuos/cesta)			Estadístico χ^2	Valor- <i>P</i>
	10	30	50		
Peso	25,74 ± 0,45	17,32 ± 0,40	15,65 ± 0,37	218,84	<0,001
Diámetro	40,50 ± 0,31	34,52 ± 0,28	33,30 ± 0,25	249,41	<0,001

Tabla 4-34.- Resultado del ANOVA para la variable altura.

Fuente	Suma cuadr.	Grados libertad	Media cuadr.	F-Ratio	P-valor
Entre grupos	1576,07	2	788,035	111,29	0,0000
Dentro grupos	6344,24	896	7,08062		
Total (Corr.)	7920,31	898			

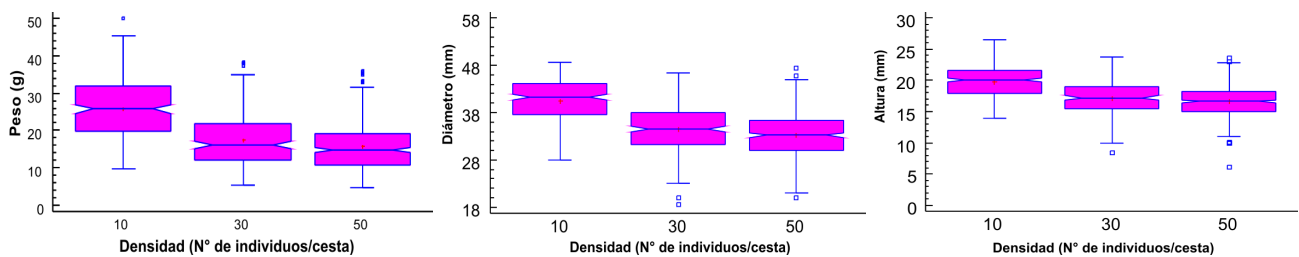


Figura 4-25.- Representación gráfica de las medias obtenidas con las 3 densidades para cada variable.

Pienso seco:

El p -valor es $<0,001$ (tabla 4-35), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias, hay diferencias significativas entre las tres densidades de cultivo para las variables peso y diámetro.

Tabla 4-35.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para las variables peso y diámetro.

Variable	Densidad (N° de individuos/cesta)			Estadístico χ^2	Valor- P
	10	30	50		
Peso	29,37 \pm 0,53	25,86 \pm 0,46	23,00 \pm 0,43	69,48	$<0,001$
Diámetro	41,04 \pm 0,32	39,62 \pm 0,28	37,76 \pm 0,26	64,38	$<0,001$

En el caso de la variable altura existen también diferencias significativas entre las densidades (tabla 4-36).

Tabla 4-36.- Resultado del ANOVA para la variable altura.

Fuente	Suma cuadr.	Grados libertad	Media cuadr.	F-Ratio	P -valor
Entre grupos	1099,2	2	549,598	43,10	0,0000
Dentro grupos	17201,2	1349	12,7511		
Total (Corr.)	18300,4	1351			

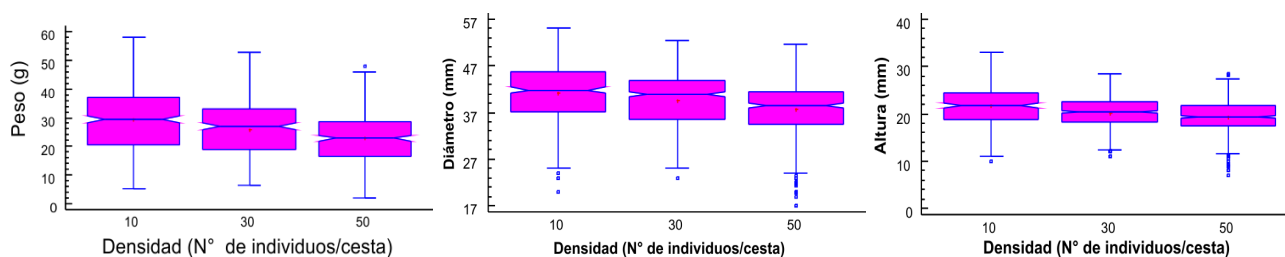


Figura 4-26.- Representación gráfica de las medias obtenidas con las 3 densidades para cada variable.

Ulva:

Igual que con el resto de las dietas existen diferencias significativas entre las densidades de cultivo de los erizos para las tres variables (tablas 4-37 y 4-38).

Tabla 4-37.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para las variables peso y diámetro.

Variable	Densidad (N° de individuos/cesta)			Estadístico χ^2	Valor- <i>P</i>
	10	30	50		
Peso	33,05 ± 0,65	27,60 ± 0,57	21,69 ± 0,52	160,58	<0,001
Diámetro	43,92 ± 0,41	40,84 ± 0,36	37,14 ± 0,33	142,11	<0,001

Tabla 4-38.- Resultado del ANOVA para la variable altura.

Fuente	Suma cuadr.	Grados libertad	Media cuadr.	F-Ratio	<i>P</i> -valor
Entre grupos	1099,2	2	549,598	43,10	0,0000
Dentro grupos	17201,2	1349	12,7511		
Total (Corr.)	18300,4	1351			

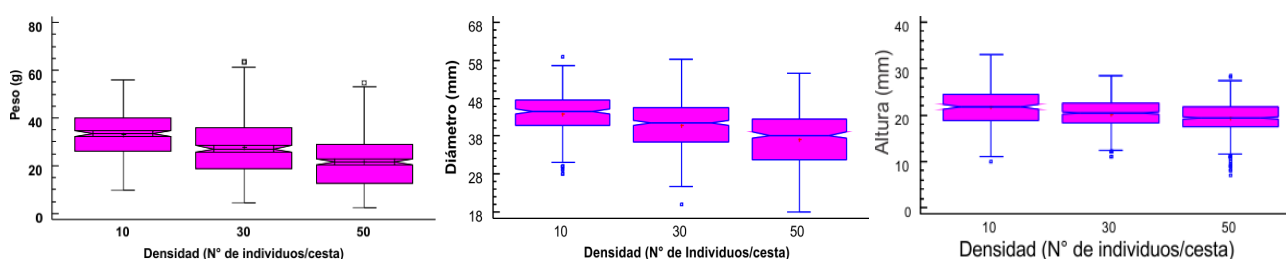


Figura 4-27.- Representación gráfica de las medias obtenidas con las 3 densidades para cada variable.

Al realizar las pruebas estadísticas tanto paramétricas como no paramétricas el resultado es que en todos los grupos de alimentación hay diferencias significativas en la media de crecimiento de los erizos en función de la densidad a la que se realice el cultivo, en todos los casos el peso, el diámetro y la altura de los erizos disminuyen a medida que aumenta la densidad de cultivo.

4.2.4. Conclusiones.

1. Las estructuras diseñadas para el engorde de erizos en batea se adaptan bien a las necesidades experimentales, pero en caso de explotación industrial se necesitarían otro tipo de diseños con más aprovechamiento del espacio entre estructuras, mayor capacidad y más fácil manejo.
2. Las dietas diseñadas tienen un buen comportamiento en cuanto a que permiten su conservación en frío sin afectar a la durabilidad en el medio acuoso, siendo aceptadas por los erizos.
3. Con las cinco dietas suministradas se ha reducido el tiempo de crecimiento de los erizos con respecto al ritmo de crecimiento que presentan los individuos en su medio natural, obteniéndose los mejores resultados con las dietas de Laminaria y Ulva.
4. Las dietas diseñadas funcionan bien y son estables en el agua, pero es necesario reformularlas con el fin de que mejoren el crecimiento de los erizos con respecto a las algas, pueden usarse como reserva en caso de temporal o problemas con el suministro de algas.
5. Las densidades de cultivo influyen significativamente en el crecimiento de los erizos, es necesario realizar nuevas experiencias que determinen la densidad adecuada a diferentes tamaños, hasta alcanzar la talla comercial.
6. El engorde hasta tamaño comercial no sería rentable a nivel industrial debido a que el precio actual de los erizos en el mercado no compensaría la inversión y el tiempo necesarios, aunque sí podría rentabilizarse un preengorde en batea de los erizos juveniles alimentados con una dieta de algas para su uso en repoblación.

4.3. Crecimiento de juveniles de *P. lividus* obtenidos en criadero, alimentados con algas.

4.3.1. Objetivo.

Comprobar la tasa de crecimiento de erizos juveniles de distintas tallas obtenidos en criadero y alimentados con algas, con vistas a su uso en repoblaciones o a conseguir erizos de tamaño comercial.

4.3.2. Materiales y métodos.

En este segundo experimento trabajamos con distintos grupos de erizos juveniles que nos llegan desde el CIMA (Centro de Investigaciones Marinas) de Ribadeo en dos tandas diferentes, en la primera de ellas tenemos dos grupos de erizos diferenciados por su tamaño:

A.- Erizos pequeños de la primera tanda:

Contamos con 390 ejemplares nacidos el 30-9-2006, estos erizos se llevaron a la batea el 10-7-2007, en esta fecha presentaban un diámetro de 5-10 mm ($8,43 \pm 1,04$), y un peso de $0,29 \pm 0,12$ g Se disponen en una cestilla ostrícola dividida por cuarterones a densidades de 200 (5120 ind/m^2), 100 (2560 ind/m^2), 60 (1536 ind/m^2) y 30 (768 ind/m^2) individuos por cuarterón.

B.- Erizos grandes de la primera tanda:

Tenemos 203 individuos nacidos y trasladados a la batea en la misma fecha que los anteriores, con un diámetro de 10-15 mm ($12,34 \pm 1,55$) y un peso de $0,87 \pm 0,34$ g Se disponen en una cestilla ostrícola con cuarterones a densidades de 100 (2560 ind/m^2), 50 (1280 ind/m^2), 30 (768 ind/m^2) y 23 (592 ind/m^2) erizos por cuarterón.

Estos erizos juveniles se alimentan *ad libitum* con algas de los géneros *Laminaria* spp. y *Ulva* spp. Las medidas morfométricas se tomaron una vez al mes empleando para ello los mismos instrumentos descritos en el apartado 3.4. del capítulo Materiales y métodos.

La primera toma de medidas morfométricas se realiza el día 14 de septiembre de 2007. Es destacable el hecho de que los erizos se trasladen de los cuarterones de mayor densidad a los de densidad más baja (los cuarterones no tenían tapa), como hemos podido comprobar; también se observan desplazamientos desde el panier de los individuos pequeños al panier de los erizos grandes. Aparentemente no existe mortalidad pero sí fugas, a pesar de que las cestas fueron reforzadas con gomas en su cara externa con el fin de minimizar el espacio existente entre las mismas al ser apiladas.

Posteriormente recibimos una segunda tanda de erizos juveniles procedentes del CIMA.

C.- Erizos de la segunda tanda:

En este segundo envío se recibieron también dos grupos de erizos, el primer grupo formado por erizos de talla comprendida entre 10 y 15 mm y un segundo grupo de erizos cuyo diámetro superaba los 15 mm; el primero de ellos fue introducido en una caja experimental que se perdió después de la segunda medida realizada el 11 de noviembre, por lo que no fue posible continuar con el estudio de estos individuos.

En el segundo grupo hay 180 individuos nacidos entre enero y mayo de 2007 y llevados a la batea el 19-10-2007, con un diámetro de 15 mm ($15,38 \pm 2,17$) y un peso de $1,85 \pm 0,69$ g. Se disponen en una cestilla ostrícola sin separación por densidades (1.440 ind/m^2).

El día 19 de octubre de 2007 se realiza la primera toma de medidas morfométricas de estos erizos. Las medidas morfométricas se siguen tomando con una periodicidad de un mes hasta el final del experimento, la mortalidad en este grupo de erizos es prácticamente nula, aunque se producen desplazamientos entre los cuarterones e incluso de uno a otro panier, lo que hace variar las densidades de cultivo, debido a este problema el 23 de mayo de 2008 decidimos sacar los cuarterones de los paniers para unificar las densidades de los erizos en una sola.

Por otra parte, el día 17 de enero de 2009 desdoblamos las tres cestas que contienen los erizos juveniles procedentes de cultivo con el fin de disminuir la densidad de las mismas

al haberse producido un incremento considerable en el tamaño de los individuos, pasamos los erizos de cada cesta a otras dos que contendrán la mitad de los ejemplares cada una, así nos quedarán seis cestas todas en la misma torre que numeramos de 1 a 6 empezando por abajo, las cestas 1 y 2 contienen los erizos grandes (10-15 mm de diámetro) de la primera tanda, las cestas 3 y 4 contienen los erizos pequeños (5-10 mm de diámetro) de la primera tanda y las cestas 5 y 6 corresponden a los erizos juveniles de la segunda tanda.

El 2 de julio de 2008 se llevan a la batea 4.244 nuevos erizos nacidos en el CIMA de Ribadeo al principio del proyecto, son colas del año 2007. Se miden la talla, la altura y el peso de estos nuevos individuos y se mantienen alimentados con algas con objeto de reponer las posibles pérdidas que se produzcan en las cestillas ostrícolas experimentales. El día 20 agosto de 2008 se vuelven a tomar medidas morfométricas de este grupo de erizos, al contabilizarlos nuevamente comprobamos que quedan 3.300 ejemplares de los 4.244 que se introdujeron en la batea el 2 de julio, el resto se supone que murieron o escaparon desde esta fecha. Estos individuos se distribuyen en dos grupos de cestas ostrícolas, el primero de ellos compuesto por cinco paniers con 200 individuos cada uno (1.000), y un segundo grupo formado por otros seis paniers, cinco de ellos con 400 erizos y el panier superior con 300 (2.300); ambos grupos son alimentados con algas. Al observar los datos obtenidos en la toma de medidas morfométricas podemos comprobar que existe una dispersión de tallas muy grande en este grupo de erizos. El 23 enero de 2009 se llevan otros 500 erizos a la batea, son individuos juveniles nacidos en el CIMA de Ribadeo en 2007 que constituyen los restos de las puestas de ese año.

A continuación se presentan los resultados de crecimiento obtenidos (tabla 4-39) para cada uno de los grupos experimentales durante el tiempo de duración del engorde de los erizos (1370 días en el caso de los erizos de la 1ª tanda y 1269 días los erizos de la 2ª tanda):

Tabla 4-39.- Datos de crecimiento de los erizos durante el tiempo de cultivo en batea.

GRUPO	Pequeños 1ª tanda	Grandes 1ª tanda	2ª tanda
Diámetro inicial de caparazón (mm)	8,43±1,04	12,34±1,55	15,38±2,17
Diámetro final de caparazón (mm)	43,68±7,98	44,34±4,56	42,78±8,80
Tasa de crecimiento lineal (µm/día)	25,88	23,49	21,73
Peso húmedo inicial (g)	0,29±0,12	0,87±0,34	1,85±0,69
Peso húmedo final (g)	38,00±19,14	37,00±12,20	36,50±23,12
Tasa de crecimiento específico (%/día)	0,12	0,09	0,08

4.3.3. Resultados y discusión.

4.3.3.1. Evolución del peso y del diámetro de los erizos juveniles procedentes de criadero.

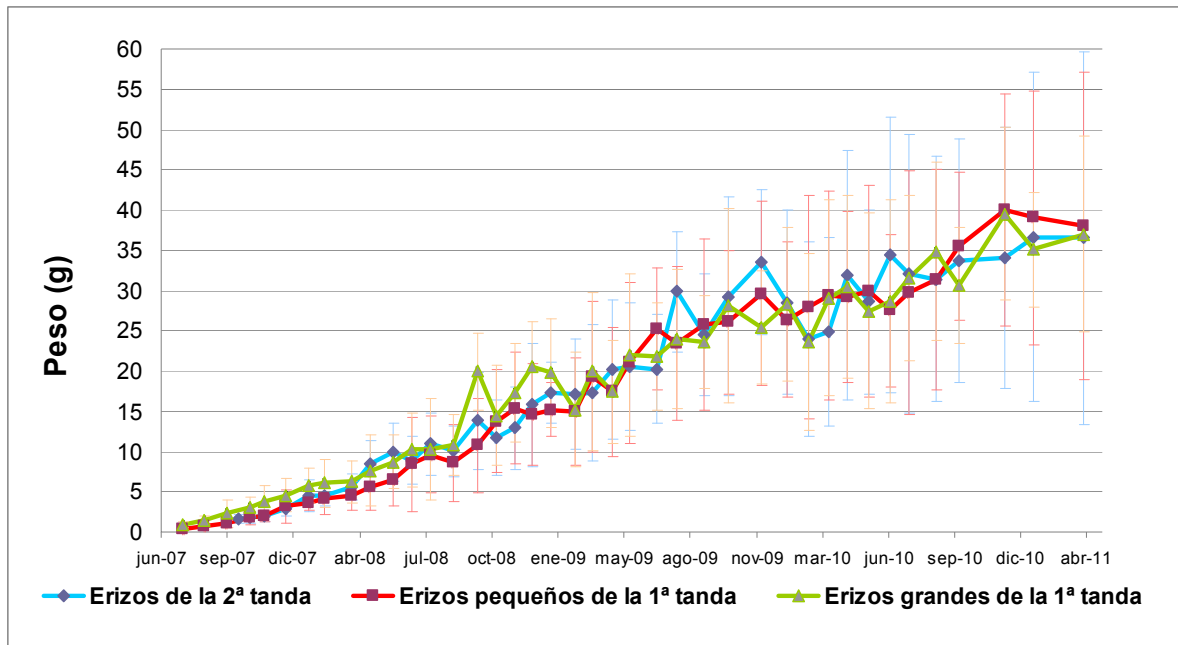


Figura 4-28.- Evolución del peso de los 3 grupos de erizos juveniles procedentes de criadero.

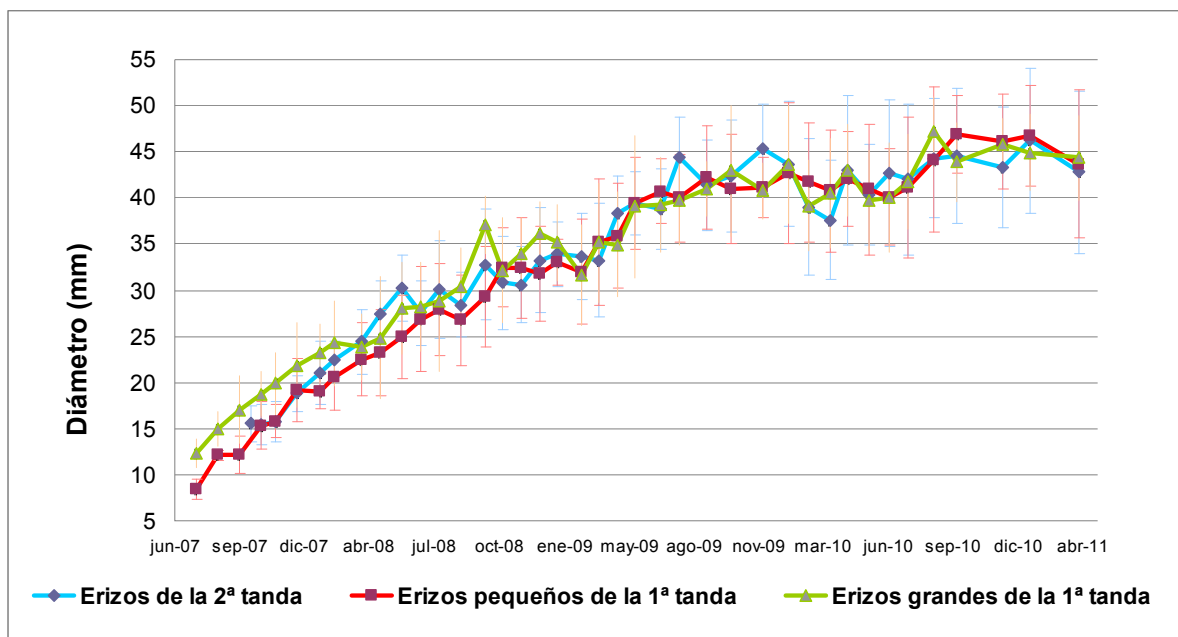


Figura 4-29.- Evolución del diámetro de los 3 grupos de erizos juveniles procedentes de criadero.

En la representación gráfica de la evolución del peso y del diámetro de los erizos vemos que las series son heterocedásticas, observándose que la variabilidad de la serie aumenta a lo largo del tiempo.

No parecen existir diferencias de crecimiento importantes entre las distintas densidades al inicio del cultivo, mientras éstas se mantuvieron; se hace necesario el desdoble de las cestas a medida que progresa el cultivo debido al aumento de tamaño de los individuos. La mortalidad es casi nula, pero sí se producen escapes de los erizos juveniles, por lo que es necesario mejorar las infraestructuras de confinamiento. Se produce una homogenización del crecimiento de los diferentes grupos, con tasas de crecimiento superiores en los individuos que parten de un tamaño más pequeño. Observando la evolución del aumento de diámetro de los erizos juveniles de la primera tanda nacidos el 30 de septiembre de 2006 (Fig 4-29), y considerando que un tamaño de 20 mm de diámetro es adecuado para que los erizos juveniles destinados a repoblación sobrevivan a los depredadores, se podrían obtener individuos aptos para repoblar zonas sobreexplotadas en un año y tres meses aproximadamente. En la figura 4-30 podemos ver la representación gráfica integrada de la evolución del peso y del diámetro de los tres grupos de erizos.

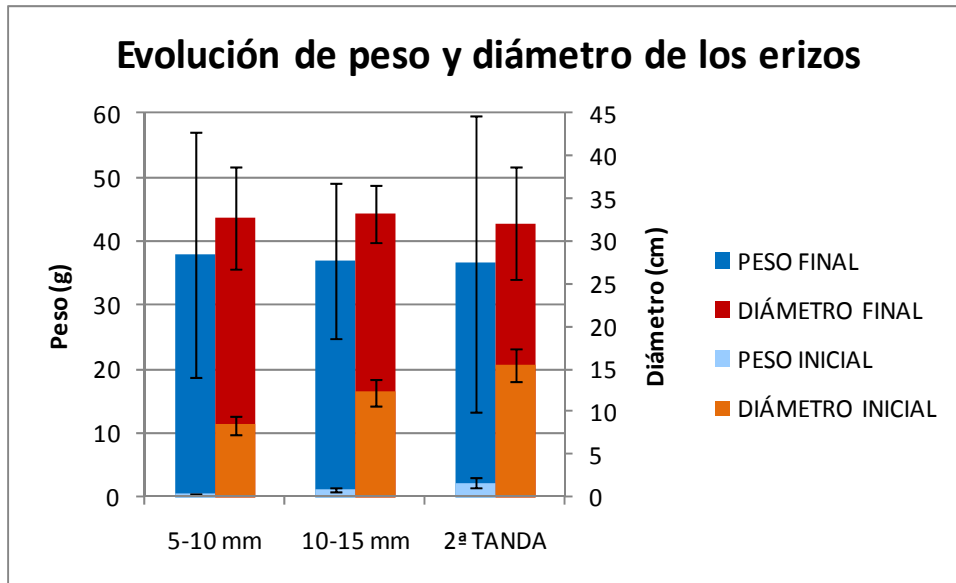


Figura 4-30.- Gráfico que integra la evolución del peso y del diámetro de los erizos de los tres grupos.

Hemos calculado además la tasa de crecimiento lineal (Fig 4-31) para cada grupo experimental, expresada en micrómetros/día y considerada mes a mes:

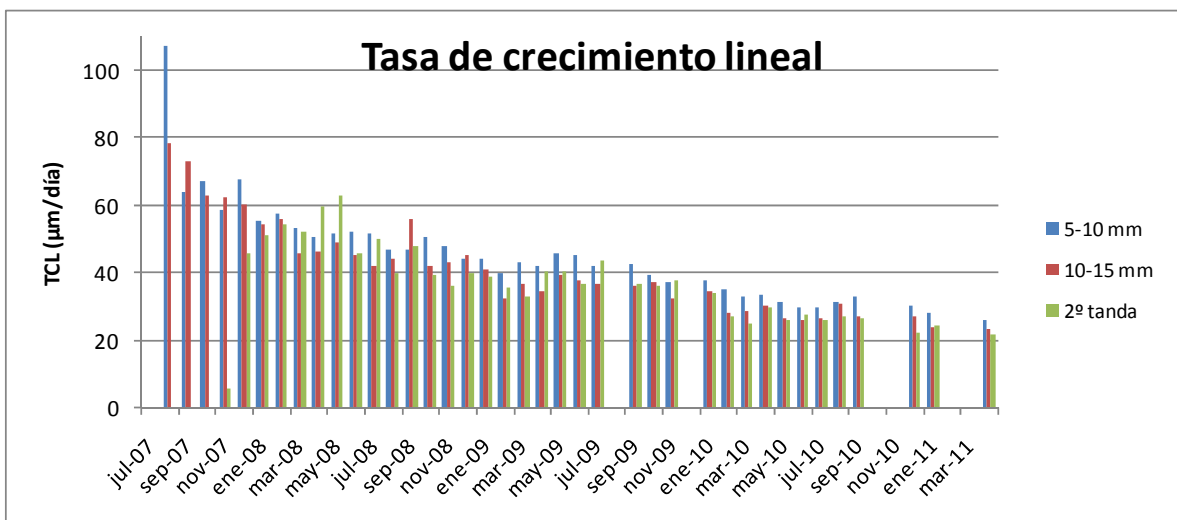


Figura 4-31.- Evolución de la tasa de crecimiento lineal de los erizos desde el inicio del experimento.

Como podemos observar, las dos representaciones gráficas nos indican que el crecimiento se reduce con el tiempo, es decir, la velocidad con la que crecen los erizos, o tasa de crecimiento lineal, es inversamente proporcional al tamaño de los individuos, obteniéndose valores máximos de crecimiento al comienzo del experimento, de 107,42 $\mu\text{m}/\text{día}$ hasta valores de 21,73 $\mu\text{m}/\text{día}$ al finalizar el mismo. Si se representara gráficamente el crecimiento de los erizos juveniles procedentes del medio natural a lo largo del experimento y se comparara con el crecimiento de los erizos procedentes de criadero veríamos que ambos siguen la misma tendencia y casi llegan a unificarse en los últimos meses.

4.3.3.2. Tratamiento estadístico.

Para este experimento se han calculado los crecimientos absoluto (CA) y relativo (CR), además de las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR) de acuerdo con las fórmulas propuestas por Busacker *et al.*, 1990. Se evaluó también la tasa instantánea de crecimiento (Ricker, 1979), la cual se denomina también tasa de crecimiento específico (TCE). Realizamos también un análisis estadístico de los datos obtenidos. La tabla 4-40 contiene la información de los estadísticos descriptivos más relevantes:

1ª Tanda. Erizos grandes.

Tabla 4-40.- Estadísticos descriptivos de los erizos grandes de la 1ª tanda.

	DIÁMETRO	PESO
Mínimo:	10.58	0.500
1 ^{er} cuartil:	20.52	3.695
Mediana:	27.27	8.100
Media:	28.52	12.531
3 ^{er} cuartil:	36.20	17.900
Máximo:	54.20	65.000

En este grupo de erizos se hicieron 39 mediciones desde el 10/07/2007 al 01/04/2011. El diámetro promedio de la muestra al inicio del experimento era de 12,34 mm, el diámetro promedio final es de 44,34 mm. En el caso del peso, al inicio del experimento el peso promedio era de 0,87 g, el peso promedio final es de 37,00 g. En la tabla 4-41 se

presentan los datos de crecimiento absoluto (CA) y relativo (CR), así como las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR) y la tasa instantánea de crecimiento (TCE).

Tabla 4-41.- Datos de CA, CR, TCA, TCR y TCE del diámetro de los erizos grandes de la 1ª tanda.

FECHA	Promedio de DIAMETRO (mm)	CA (mm)	CR (%)	TCA (mm/día)	TCR (%)	TCE (%/día)
10/07/2007	12,34					
12/08/2007	14,94	2,59	21,01%	0,08	0,64%	0,58
14/09/2007	17,17	2,24	14,97%	0,07	0,45%	0,42
19/10/2007	18,65	1,47	8,59%	0,04	0,25%	0,24
10/11/2007	20,00	1,35	7,22%	0,06	0,33%	0,32
13/12/2007	21,71	1,71	8,55%	0,05	0,26%	0,25
17/01/2008	22,70	0,99	4,58%	0,03	0,13%	0,13
08/02/2008	24,30	1,60	7,03%	0,07	0,32%	0,31
23/02/2008	31,67	7,38	30,36%	0,49	2,02%	1,77
21/03/2008	26,26	-5,41	-17,09%	-0,20	-0,63%	-0,69
18/04/2008	25,41	-0,86	-3,26%	-0,03	-0,12%	-0,12
23/05/2008	27,96	2,55	10,04%	0,07	0,29%	0,27
20/06/2008	27,94	-0,01	-0,05%	0,00	0,00%	0,00
20/07/2008	28,07	0,13	0,46%	0,00	0,02%	0,02
21/08/2008	30,36	2,29	8,16%	0,07	0,25%	0,25
27/09/2008	37,15	6,78	22,34%	0,18	0,60%	0,55
25/10/2008	32,16	-4,99	-13,42%	-0,18	-0,48%	-0,51
22/11/2008	33,96	1,80	5,60%	0,06	0,20%	0,19
20/12/2008	36,21	2,25	6,62%	0,08	0,24%	0,23
17/01/2009	35,19	-1,02	-2,83%	-0,04	-0,10%	-0,10
20/04/2009	34,96	-0,23	-0,65%	0,00	-0,01%	-0,01
16/05/2009	39,05	4,09	11,70%	0,16	0,45%	0,43
26/06/2009	40,27	1,22	3,12%	0,03	0,08%	0,08
25/07/2009	39,72	-0,56	-1,38%	-0,02	-0,05%	-0,05
05/09/2009	41,02	1,30	3,28%	0,03	0,08%	0,08
11/10/2009	42,96	1,94	4,72%	0,05	0,13%	0,13
30/11/2009	40,76	-2,20	-5,11%	-0,04	-0,10%	-0,10
09/01/2010	43,70	2,94	7,21%	0,07	0,18%	0,17
09/02/2010	39,19	-4,51	-10,33%	-0,15	-0,33%	-0,35
13/03/2010	40,57	1,38	3,53%	0,04	0,11%	0,11
10/04/2010	42,99	2,42	5,97%	0,09	0,21%	0,21
12/05/2010	39,70	-3,29	-7,66%	-0,10	-0,24%	-0,25
13/06/2010	40,03	0,33	0,83%	0,01	0,03%	0,03
11/07/2010	41,74	1,72	4,28%	0,06	0,15%	0,15
21/08/2010	47,25	5,51	13,19%	0,13	0,32%	0,30
25/09/2010	43,91	-3,34	-7,08%	-0,10	-0,20%	-0,21
04/12/2010	45,84	1,94	4,41%	0,03	0,06%	0,06
01/01/2011	44,92	-0,92	-2,02%	-0,03	-0,07%	-0,07
01/04/2011	44,34	-0,57	-1,28%	-0,01	-0,01%	-0,01

En la tabla se alternan datos de crecimiento positivos y negativos.

A continuación se presenta la tabla 4-42 de valores de crecimiento relativo al peso de los erizos grandes de la 1ª tanda.

Tabla 4-42.- Datos de CA, CR, TCA, TCR y TCE del peso de los erizos grandes de la 1ª tanda.

FECHA	Promedio de PESO (g)	CA (g)	CR (%)	TCA(g/día)	TCR (%)	TCE (%/día)
10/07/2007	0,87					
12/08/2007	1,37	0,50	58,00%	0,02	1,76%	1,39
14/09/2007	2,27	0,89	65,10%	0,03	1,97%	1,52
19/10/2007	3,13	0,86	37,95%	0,02	1,08%	0,92
10/11/2007	3,72	0,59	18,88%	0,03	0,86%	0,79
13/12/2007	4,56	0,84	22,64%	0,03	0,69%	0,62
17/01/2008	5,73	1,16	25,50%	0,03	0,73%	0,65
08/02/2008	6,11	0,39	6,76%	0,02	0,31%	0,30
23/02/2008	15,17	9,06	148,17%	0,60	9,88%	6,06
21/03/2008	8,98	-6,19	-40,81%	-0,23	-1,51%	-1,94
18/04/2008	7,63	-1,35	-15,07%	-0,05	-0,54%	-0,58
23/05/2008	8,71	1,09	14,27%	0,03	0,41%	0,38
20/06/2008	10,25	1,54	17,67%	0,05	0,63%	0,58
20/07/2008	10,25	0,00	-0,02%	0,00	0,00%	0,00
21/08/2008	10,76	0,51	4,93%	0,02	0,15%	0,15
27/09/2008	19,96	9,21	85,59%	0,25	2,31%	1,67
25/10/2008	14,45	-5,51	-27,61%	-0,20	-0,99%	-1,15
22/11/2008	17,26	2,81	19,45%	0,10	0,69%	0,63
20/12/2008	20,60	3,34	19,35%	0,12	0,69%	0,63
17/01/2009	19,79	-0,81	-3,93%	-0,03	-0,14%	-0,14
20/04/2009	17,44	-2,35	-11,87%	-0,03	-0,13%	-0,14
16/05/2009	22,00	4,56	26,15%	0,18	1,01%	0,89
26/06/2009	23,82	1,82	8,27%	0,04	0,20%	0,19
25/07/2009	23,96	0,14	0,59%	0,00	0,02%	0,02
05/09/2009	23,60	-0,36	-1,50%	-0,01	-0,04%	-0,04
11/10/2009	28,06	4,46	18,90%	0,12	0,52%	0,48
30/11/2009	25,38	-2,68	-9,55%	-0,05	-0,19%	-0,20
09/01/2010	30,74	5,36	21,12%	0,13	0,53%	0,48
09/02/2010	23,60	-7,14	-23,23%	-0,23	-0,75%	-0,85
13/03/2010	29,06	5,46	23,15%	0,17	0,72%	0,65
10/04/2010	30,44	1,38	4,74%	0,05	0,17%	0,17
12/05/2010	27,48	-2,97	-9,74%	-0,09	-0,30%	-0,32
13/06/2010	28,70	1,23	4,46%	0,04	0,14%	0,14
11/07/2010	31,57	2,87	10,00%	0,10	0,36%	0,34
21/08/2010	34,84	3,27	10,36%	0,08	0,25%	0,24
25/09/2010	30,65	-4,19	-12,03%	-0,12	-0,34%	-0,37
04/12/2010	39,50	8,85	28,87%	0,13	0,41%	0,36
01/01/2011	35,12	-4,38	-11,09%	-0,16	-0,40%	-0,42
01/04/2011	37,00	1,88	5,35%	0,02	0,06%	0,06

1ª Tanda. Erizos pequeños.

Tabla 4-43.- Estadísticos descriptivos de los erizos pequeños de la 1ª tanda.

	DIAMETRO	PESO
Mínimo:	6.46	0.1118
1 ^{er} cuartil:	16.17	2.000
Mediana:	23.32	5.175
Media:	25.62	10.729
3 ^{er} cuartil	33.96	15.100
Máximo:	60.17	73.000

Este grupo de erizos se mantuvo en la batea durante el mismo período que los erizos grandes, desde el 10/07/2007 al 01/04/2011. Cuando se inició el experimento el diámetro promedio de la muestra era de 8,43 mm y el diámetro promedio final es de 43,68 mm; en el caso del peso, al inicio del experimento el peso promedio de la muestra era 0,29 g y el peso promedio final es de 38,00 g.

A continuación se presenta la tabla 4-44 con los datos de crecimiento relativos al diámetro de este grupo de erizos.

Tabla 4-44.- Datos de CA, CR, TCA, TCR y TCE del diámetro de los erizos pequeños de la 1ª tanda.

FECHA	Promedio de DIAMETRO (mm)	CA (mm)	CR (%)	TCA (mm/día)	TCR (%)	TCE (%/día)
10/07/2007	8,43					
12/08/2007	11,97	3,54	42,07%	0,11	1,27%	1,06
14/09/2007	12,63	0,66	5,53%	0,02	0,17%	0,16
02/10/2007	11,86	-0,77	-6,13%	-0,04	-0,34%	-0,35
19/10/2007	14,58	2,72	22,97%	0,16	1,35%	1,22
10/11/2007	14,97	0,39	2,67%	0,02	0,12%	0,12
13/12/2007	18,98	4,01	26,79%	0,12	0,81%	0,72
17/01/2008	19,03	0,05	0,27%	0,00	0,01%	0,01
08/02/2008	20,65	1,62	8,49%	0,07	0,39%	0,37
23/02/2008	32,02	11,38	55,10%	0,76	3,67%	2,93
21/03/2008	24,69	-7,33	-22,89%	-0,27	-0,85%	-0,96
18/04/2008	22,73	-1,97	-7,97%	-0,07	-0,28%	-0,30
23/05/2008	24,91	2,19	9,62%	0,06	0,27%	0,26
20/06/2008	26,44	1,53	6,14%	0,05	0,22%	0,21
20/07/2008	27,83	1,39	5,26%	0,05	0,18%	0,17
21/08/2008	27,45	-0,38	-1,38%	-0,01	-0,04%	-0,04
27/09/2008	29,23	1,78	6,49%	0,05	0,18%	0,17
25/10/2008	32,48	3,25	11,12%	0,12	0,40%	0,38
22/11/2008	32,47	-0,02	-0,06%	0,00	0,00%	0,00
20/12/2008	31,78	-0,69	-2,13%	-0,02	-0,08%	-0,08
17/01/2009	33,09	1,31	4,12%	0,05	0,15%	0,14
20/04/2009	35,90	2,82	8,52%	0,03	0,09%	0,09
16/05/2009	39,39	3,49	9,71%	0,13	0,37%	0,36
26/06/2009	41,03	1,64	4,15%	0,04	0,10%	0,10
25/07/2009	39,97	-1,06	-2,57%	-0,04	-0,09%	-0,09
05/09/2009	42,17	2,20	5,49%	0,05	0,13%	0,13
11/10/2009	41,04	-1,13	-2,67%	-0,03	-0,07%	-0,08
30/11/2009	41,14	0,10	0,23%	0,00	0,00%	0,00
09/01/2010	42,74	1,60	3,89%	0,04	0,10%	0,10
09/02/2010	41,73	-1,01	-2,37%	-0,03	-0,08%	-0,08
13/03/2010	40,75	-0,98	-2,34%	-0,03	-0,07%	-0,07
10/04/2010	42,06	1,31	3,21%	0,05	0,11%	0,11
12/05/2010	40,95	-1,11	-2,63%	-0,03	-0,08%	-0,08
13/06/2010	40,12	-0,83	-2,03%	-0,03	-0,06%	-0,06
11/07/2010	41,12	1,00	2,50%	0,04	0,09%	0,09
21/08/2010	44,14	3,01	7,33%	0,07	0,18%	0,17
25/09/2010	46,94	2,80	6,34%	0,08	0,18%	0,18
04/12/2010	46,09	-0,85	-1,81%	-0,01	-0,03%	-0,03
01/01/2011	46,69	0,60	1,30%	0,02	0,05%	0,05
01/04/2011	43,68	-3,01	-6,45%	-0,03	-0,07%	-0,07

Tabla 4-45.- Datos de CA, CR, TCA, TCR y TCE del peso de los erizos pequeños de la 1ª tanda.

FECHA	Promedio de PESO (g)	CA (g)	CR (%)	TCA (g/día)	TCR (%)	TCE (%/día)
10/07/2007	0,29					
12/08/2007	0,78	0,49	169,82%	0,01	5,15%	3,01
14/09/2007	1,03	0,25	31,63%	0,01	0,96%	0,83
02/10/2007	0,77	-0,26	-25,45%	-0,01	-1,41%	-1,63
19/10/2007	1,57	0,80	104,43%	0,05	6,14%	4,21
10/11/2007	1,73	0,16	10,16%	0,01	0,46%	0,44
13/12/2007	3,19	1,46	84,09%	0,04	2,55%	1,85
17/01/2008	3,69	0,50	15,74%	0,01	0,45%	0,42
08/02/2008	4,09	0,40	10,80%	0,02	0,49%	0,47
23/02/2008	14,94	10,85	265,28%	0,72	17,69%	8,64
21/03/2008	7,48	-7,46	-49,91%	-0,28	-1,85%	-2,56
18/04/2008	5,50	-1,98	-26,50%	-0,07	-0,95%	-1,10
23/05/2008	6,53	1,03	18,70%	0,03	0,53%	0,49
20/06/2008	8,40	1,87	28,67%	0,07	1,02%	0,90
20/07/2008	9,60	1,20	14,26%	0,04	0,48%	0,44
21/08/2008	8,59	-1,01	-10,52%	-0,03	-0,33%	-0,35
27/09/2008	10,74	2,15	25,07%	0,06	0,68%	0,60
25/10/2008	13,72	2,98	27,75%	0,11	0,99%	0,87
22/11/2008	15,36	1,64	11,95%	0,06	0,43%	0,40
20/12/2008	14,62	-0,74	-4,82%	-0,03	-0,17%	-0,18
17/01/2009	15,20	0,58	3,97%	0,02	0,14%	0,14
20/04/2009	17,45	2,25	14,80%	0,02	0,16%	0,15
16/05/2009	21,00	3,55	20,34%	0,14	0,78%	0,71
26/06/2009	26,15	5,15	24,52%	0,13	0,60%	0,53
25/07/2009	23,44	-2,71	-10,36%	-0,09	-0,36%	-0,38
05/09/2009	25,72	2,28	9,73%	0,05	0,23%	0,22
11/10/2009	26,07	0,35	1,36%	0,01	0,04%	0,04
30/11/2009	29,63	3,56	13,66%	0,07	0,27%	0,26
09/01/2010	28,60	-1,03	-3,48%	-0,03	-0,09%	-0,09
09/02/2010	27,90	-0,70	-2,45%	-0,02	-0,08%	-0,08
13/03/2010	29,39	1,49	5,33%	0,05	0,17%	0,16
10/04/2010	29,17	-0,22	-0,74%	-0,01	-0,03%	-0,03
12/05/2010	29,87	0,70	2,41%	0,02	0,08%	0,07
13/06/2010	27,52	-2,35	-7,87%	-0,07	-0,25%	-0,26
11/07/2010	29,72	2,20	7,99%	0,08	0,29%	0,27
21/08/2010	31,31	1,59	5,35%	0,04	0,13%	0,13
25/09/2010	35,52	4,21	13,45%	0,12	0,38%	0,36
04/12/2010	40,00	4,48	12,61%	0,06	0,18%	0,17
01/01/2011	39,01	-0,99	-2,48%	-0,04	-0,09%	-0,09
01/04/2011	38,00	-1,01	-2,59%	-0,01	-0,03%	-0,03

2ª Tanda. Erizos grandes.

Tabla 4-46.- Estadísticos descriptivos de los erizos grandes de la 2ª tanda.

	DIAMETRO	PESO
Mínimo:	11.67	0.810
1 ^{er} cuartil:	19.76	3.175
Mediana:	31.82	12.200
Media:	31.23	16.325
3 ^{er} cuartil	40.48	25.725
Máximo:	61.26	84.200

En el caso de los erizos de la 2ª tanda se hicieron 37 mediciones, se mantuvieron en la batea desde el 02/10/2007 al 01/04/2011. Cuando se inició el experimento el diámetro promedio de la muestra era de 15,53 mm, el diámetro final es de 42,78 mm. El peso promedio de la muestra al inicio del experimento era de 1,68 g, al final del experimento el peso promedio de los erizos es de 36,50 g.

En las tablas que siguen (tablas 4-47 y 4-48) se presenta el crecimiento absoluto (CA) y relativo (CR), así como las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR) y la tasa instantánea de crecimiento (TCE) de los erizos grandes de la 2ª tanda en relación al diámetro y al peso.

Tabla 4-47.- Datos de CA, CR, TCA, TCR y TCE del diámetro de los erizos grandes de la 2ª tanda.

FECHA	Promedio de DIAMETRO (mm)	CA (mm)	CR (%)	TCA (mm/día)	TCR (%)	TCE (%/día)
02/10/2007	15,53					
19/10/2007	15,38	-0,15	-0,96%	-0,01	-0,06%	-0,06
10/11/2007	15,75	0,37	2,41%	0,02	0,11%	0,11
13/12/2007	18,83	3,07	19,51%	0,09	0,59%	0,54
17/01/2008	21,03	2,20	11,68%	0,06	0,33%	0,32
08/02/2008	22,51	1,49	7,06%	0,07	0,32%	0,31
23/02/2008	33,70	11,19	49,72%	0,75	3,31%	2,69
21/03/2008	28,82	-4,88	-14,48%	-0,18	-0,54%	-0,58
18/04/2008	27,43	-1,39	-4,84%	-0,05	-0,17%	-0,18
23/05/2008	30,21	2,78	10,14%	0,08	0,29%	0,28
20/06/2008	27,55	-2,66	-8,80%	-0,09	-0,31%	-0,33
20/07/2008	30,08	2,53	9,20%	0,08	0,31%	0,29
21/08/2008	28,40	-1,68	-5,59%	-0,05	-0,17%	-0,18
27/09/2008	32,78	4,37	15,39%	0,12	0,42%	0,39
25/10/2008	30,79	-1,98	-6,06%	-0,07	-0,22%	-0,22
22/11/2008	30,61	-0,18	-0,59%	-0,01	-0,02%	-0,02
20/12/2008	33,26	2,65	8,67%	0,09	0,31%	0,30
17/01/2009	33,91	0,65	1,96%	0,02	0,07%	0,07
20/04/2009	38,33	4,42	13,03%	0,05	0,14%	0,13
16/05/2009	39,42	1,09	2,84%	0,04	0,11%	0,11
26/06/2009	39,75	0,33	0,84%	0,01	0,02%	0,02
25/07/2009	44,45	4,70	11,82%	0,16	0,41%	0,39
05/09/2009	41,40	-3,05	-6,86%	-0,07	-0,16%	-0,17
11/10/2009	42,38	0,97	2,35%	0,03	0,07%	0,06
30/11/2009	45,36	2,98	7,03%	0,06	0,14%	0,14
09/01/2010	43,69	-1,66	-3,67%	-0,04	-0,09%	-0,09
09/02/2010	39,03	-4,66	-10,67%	-0,15	-0,34%	-0,36
13/03/2010	37,62	-1,41	-3,62%	-0,04	-0,11%	-0,12
10/04/2010	43,04	5,42	14,39%	0,19	0,51%	0,48
12/05/2010	40,33	-2,70	-6,29%	-0,08	-0,20%	-0,20
13/06/2010	42,71	2,38	5,90%	0,07	0,18%	0,18
11/07/2010	42,01	-0,70	-1,64%	-0,03	-0,06%	-0,06
21/08/2010	44,30	2,29	5,45%	0,06	0,13%	0,13
25/09/2010	44,59	0,29	0,66%	0,01	0,02%	0,02
04/12/2010	43,33	-1,26	-2,83%	-0,02	-0,04%	-0,04
01/01/2011	46,20	2,88	6,64%	0,10	0,24%	0,23
01/04/2011	42,78	-3,43	-7,41%	-0,04	-0,08%	-0,09

Tabla 4-48.- Datos de CA, CR, TCA, TCR y TCE del peso de los erizos grandes de la 2ª tanda.

FECHA	Promedio de PESO (g)	CA (g)	CR (%)	TCA (g/día)	TCR (%)	TCE (%/día)
02/10/2007	1,68					
19/10/2007	1,85	0,18	10,47%	0,01	0,62%	0,59
10/11/2007	1,91	0,06	3,15%	0,00	0,14%	0,14
13/12/2007	2,83	0,91	47,88%	0,03	1,45%	1,19
17/01/2008	4,53	1,70	60,35%	0,05	1,72%	1,35
08/02/2008	4,59	0,05	1,21%	0,00	0,06%	0,05
23/02/2008	17,13	12,55	273,61%	0,84	18,24%	8,79
21/03/2008	11,45	-5,69	-33,19%	-0,21	-1,23%	-1,49
18/04/2008	8,40	-3,05	-26,61%	-0,11	-0,95%	-1,10
23/05/2008	9,94	1,54	18,31%	0,04	0,52%	0,48
20/06/2008	8,90	-1,04	-10,44%	-0,04	-0,37%	-0,39
20/07/2008	10,92	2,02	22,70%	0,07	0,76%	0,68
21/08/2008	10,05	-0,87	-7,97%	-0,03	-0,25%	-0,26
27/09/2008	13,81	3,76	37,41%	0,10	1,01%	0,86
25/10/2008	11,65	-2,16	-15,64%	-0,08	-0,56%	-0,61
22/11/2008	12,93	1,28	10,99%	0,05	0,39%	0,37
20/12/2008	15,81	2,88	22,27%	0,10	0,80%	0,72
17/01/2009	17,27	1,46	9,23%	0,05	0,33%	0,32
20/04/2009	20,15	2,88	16,68%	0,03	0,18%	0,17
16/05/2009	20,50	0,35	1,74%	0,01	0,07%	0,07
26/06/2009	22,25	1,75	8,54%	0,04	0,21%	0,20
25/07/2009	29,84	7,59	34,11%	0,26	1,18%	1,01
05/09/2009	24,51	-5,33	-17,86%	-0,13	-0,43%	-0,47
11/10/2009	29,27	4,76	19,42%	0,13	0,54%	0,49
30/11/2009	33,49	4,22	14,42%	0,08	0,29%	0,27
09/01/2010	31,30	-2,19	-6,54%	-0,05	-0,16%	-0,17
09/02/2010	24,00	-7,30	-23,32%	-0,24	-0,75%	-0,86
13/03/2010	24,89	0,89	3,70%	0,03	0,12%	0,11
10/04/2010	31,96	7,07	28,41%	0,25	1,01%	0,89
12/05/2010	28,59	-3,37	-10,55%	-0,11	-0,33%	-0,35
13/06/2010	34,37	5,78	20,23%	0,18	0,63%	0,58
11/07/2010	32,07	-2,30	-6,69%	-0,08	-0,24%	-0,25
21/08/2010	31,43	-0,64	-2,00%	-0,02	-0,05%	-0,05
25/09/2010	33,68	2,25	7,16%	0,06	0,20%	0,20
04/12/2010	34,00	0,32	0,95%	0,00	0,01%	0,01
01/01/2011	36,66	2,66	7,82%	0,10	0,28%	0,27
01/04/2011	36,50	-0,16	-0,44%	0,00	0,00%	0,00

Los valores del crecimiento son oscilantes debido a que se selecciona un número de individuos al azar de cada cestilla para la toma de medidas morfométricas.

4.3.4. Conclusiones.

1. Se necesita mejorar los sistemas de confinamiento de los erizos pequeños, tanto para realizar experiencias con diferentes densidades, como para evitar los escapes.
2. El engorde de erizos juveniles en batea mediante el uso de macroalgas, hasta que alcancen un tamaño adecuado para su introducción en el medio natural, es una alternativa viable para realizar programas de repoblación.

4.4. Efecto de diferentes dietas experimentales sobre el índice gonadal de *P. lividus*.

4.4.1. Objetivo.

Cuantificar el incremento en porcentaje corporal de las gónadas de los erizos durante la duración del experimento, de forma comparativa entre los diferentes grupos de alimentación.

4.4.2. Materiales y métodos.

Con esta experiencia pretendemos averiguar la influencia que tiene la alimentación de los erizos en el tamaño de sus gónadas; para ello comparamos el índice gonadal de erizos de tamaño comercial procedentes del medio natural, con el IG de erizos alimentados en la batea con piensos que elaboramos en el laboratorio.

El tamaño de las gónadas en relación al erizo viene determinado por el índice gonadosomático, que se define como la razón entre el peso fresco o seco de las gónadas y el peso fresco o seco del individuo. Esta medida se obtuvo secando previamente los erizos en un papel absorbente durante cinco minutos para eliminar el agua sobrante, y pesándolos después empleando para ello una balanza de precisión; posteriormente se

disecciona el erizo mediante un corte circular y se extraen las cinco gónadas cuidadosamente, éstas se pesan también para obtener el índice gonadosomático del erizo. La información morfométrica recabada de cada erizo es por lo tanto su peso fresco, el peso de sus gónadas, su diámetro y su altura, obteniendo así la información necesaria para determinar con la mayor precisión posible el aumento de tamaño de los ejemplares. El índice gonadosomático se ha calculado de distintas formas en diversos trabajos (Moore, 1934; Lawrence *et al.*, 1965; Fuji, 1967; Fenaux, 1968; Gonor, 1972; Régis, 1979; Semroud & Kada, 1987; Grosjean *et al.*, 1998), en este estudio calcularemos el índice gonadal basándonos en el trabajo de Grosjean *et al.*, 1998; por tanto el porcentaje gonadal se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{IGS (\%)} = (\text{peso gonadal} / \text{peso del erizo}) \times 100$$

4.4.2.1. Engorde de gónadas. Experiencia preliminar.

Esta primera experiencia de un año de duración consistió en comparar la evolución del índice gonadal de erizos procedentes del medio natural (Finisterre), con el índice gonadal que presenten los erizos estabulados en la batea, procedentes de la misma localidad, y alimentados con tres tipos de dietas: dos piensos fabricados por nosotros en el laboratorio con un contenido del 20% y del 30% de proteína (Rey-Méndez *et al.*, 2009) y otro grupo alimentado con algas de los géneros *Ulva* spp. y *Laminaria* spp. El objetivo de esta experiencia preliminar es determinar qué porcentaje de proteína del pienso es el más adecuado para incrementar el IG de los erizos.

Con el fin de conocer el incremento del porcentaje gonadal de los erizos en el tiempo, se midieron los índices gonadosomáticos de diez ejemplares de cada grupo a estudiar al principio del experimento. Estas medidas se realizan a diez individuos de cada grupo con una periodicidad de un mes durante la duración del experimento para comprobar la evolución diferencial de cada dieta. El 4 de enero de 2008 se tomaron las primeras

medidas de peso, diámetro, altura y peso gonadal de los erizos, y se calculó el índice gonadal correspondiente a los erizos de tamaño comercial mantenidos en la batea, con el fin de comparar mensualmente estos datos con los obtenidos de los erizos extraídos del medio natural y comprobar así el efecto que tienen las distintas dietas sobre este parámetro.

Por otro lado obtendremos los datos de un grupo de erizos procedentes de la misma localidad (Finisterre) que son extraídos del medio natural con una periodicidad mensual. La medida del IG de estos erizos se realiza en las instalaciones del CIMA de Ribadeo desde donde nos son facilitados los datos, el primero de los cuales se obtiene el 31 de diciembre de 2007. Este experimento se mantiene durante un año (diciembre 2007-enero 2009) obteniéndose las medidas del IG una vez al mes.

4.4.2.2. Engorde de gónadas.

En esta segunda fase nos centramos en buscar el incremento del IG a corto plazo, los grupos experimentales se mantienen un máximo de dos meses con un mismo tipo de pienso (variaciones del pienso inicial del 30% de contenido proteico), para observar si el incremento o la disminución de ciertos componentes pueden influir sobre el IG.

El primer experimento bimensual comienza el día 23 de febrero de 2009. Una vez que se ha determinado el IG de los erizos de tamaño comercial procedentes de Finisterre, éstos se distribuyen en los siete grupos experimentales que serán alimentados con diferentes piensos o con algas, a continuación se detalla la composición de las dietas suministradas en este experimento:

- **DIETA 1: 30% de contenido proteico (antigua).** Esta dieta está compuesta fundamentalmente por una combinación de diferentes harinas (maíz, trigo, soja), harina de pescado y gelatina de cerdo.
- **DIETA 2: variación de la anterior con algas.**
- **DIETA 3: igual a la dieta 2 pero con más harina de trigo sustituyendo a la maicena y a la harina de soja.**
- **DIETA 4: igual a la dieta 2 pero con más harina de pescado, se utilizan la microalga *Dunaliella salina* y la Cantaxantina como fuente de carotenos.**

- **DIETA 5:** igual a la dieta 4 con harina de trigo sustituyendo a la maicena y a la harina de soja.
- **DIETA 6:** igual a la dieta 5 con la diferencia de que en esta dieta la harina de trigo sustituye también al almidón.
- **DIETA 7:** Mezcla de *Ulva rigida* y algas laminariales.



Figura 4-32.- Piensos 2, 4 y 5 elaborados en el laboratorio. (Foto: J. Rodríguez-Castro).

Cada grupo se distribuye en dos paniers o cestas ostrícolas. La alimentación se suministró semanalmente, en cantidad suficiente para que no desapareciera totalmente al final de los siete días. El 21 de marzo y el 18 de abril se toman las medidas de peso, diámetro, altura, color y peso de las gónadas de los erizos comerciales mantenidos en la batea.

El 25 abril de 2009 comienza el segundo experimento bimensual con nuevos erizos comerciales y tres nuevas dietas: A, B y C, que sustituyen a las antiguas 1, 3 y 6. Se mantienen 2, 4 y 5 debido a su mayor efectividad en relación al incremento del índice gonadal de los erizos, además de las algas. En total contamos con 229 erizos de los cuales utilizamos 12 individuos para calcular su índice gonadal inicial y los 217 restantes se confinan en la batea distribuidos en 7 grupos de 31 erizos cada uno. Las nuevas dietas que se suministran a estos grupos de erizos son las siguientes:

- **DIETA A: similar a la dieta 1, las harinas de trigo y de pescado son sustituidas por harina de soja.**
- **DIETA B: variación de la anterior, las harinas de trigo y de pescado son sustituidas por un 50% de algas y un 50% de harina de soja.**
- **DIETA C: igual a la dieta B con la diferencia de que se utiliza 1/3 de algas, 1/3 de harina de soja y 1/3 de gelatina de cerdo para sustituir a las harinas de trigo y de pescado.**

El 23 de mayo y el 20 de junio, se toman los datos correspondientes a este experimento bimensual.

El 4 de julio de 2009 se recibe una nueva partida de erizos de Finisterre para hacer una réplica de la experiencia anterior (los erizos se alimentan con las dietas: 2, 4, 5, A, B, C y algas). El 9 de agosto y el 7 de septiembre, se toman los datos correspondientes de manera similar a las experiencias anteriores. La cuarta experiencia es muy parecida a la anterior, la única diferencia entre ellas consiste en que se elimina la dieta C y se sustituye por la dieta 4C, que es igual a la 4 con la diferencia de que la harina que lleva es experimental (facilitada por el IIM de Vigo) y está compuesta por cazón. Esta cuarta experiencia comienza el 12 de septiembre de 2009 y las medidas se toman el 11 de octubre y el 14 de noviembre respectivamente. Se eliminó la dieta C por ser la que (junto con A y B) presentó peores resultados al observar el conjunto de las 4 mediciones llevadas a cabo en los dos experimentos anteriores, con la excepción del 20 de junio del 2009, fecha en la que la dieta C presenta una mayor recuperación del índice gonadal (IG: 9,45) que las dietas A (IG: 7,77) y B (IG: 7,83).

El día 8 de diciembre de 2009 comenzamos una réplica de esta cuarta experiencia con nuevos erizos procedentes de Finisterre, ese mismo día se obtienen las medidas del IG inicial de los erizos, que se mantendrán alimentados con las mismas dietas de la experiencia anterior, los días 9 de enero y 9 de febrero de 2010 se realizarán las dos mediciones correspondientes del IG de los ejemplares de esta nueva partida.

El último experimento de incremento del índice gonadal de los erizos alimentados con siete dietas diferentes da comienzo el 13 de marzo de 2010, día en el que recibimos una nueva partida de erizos comerciales procedentes de Finisterre. Nuevamente se trata de una réplica de las experiencias anteriores, las dietas utilizadas en esta última réplica son las mismas: algas, 2, 4, 5, A, B y 4C. Las medidas del índice gonadal de los erizos se obtienen los días 10 de abril y 10 de mayo de 2010.

4.4.3. Resultados y discusión.

4.4.3.1. Experiencia preliminar.

En la figura 4-33 se representan las medidas del índice gonadal de los erizos obtenidas durante los meses transcurridos desde el inicio del experimento, exceptuando el mes de agosto durante el cual no se obtuvieron medidas del índice gonadal.

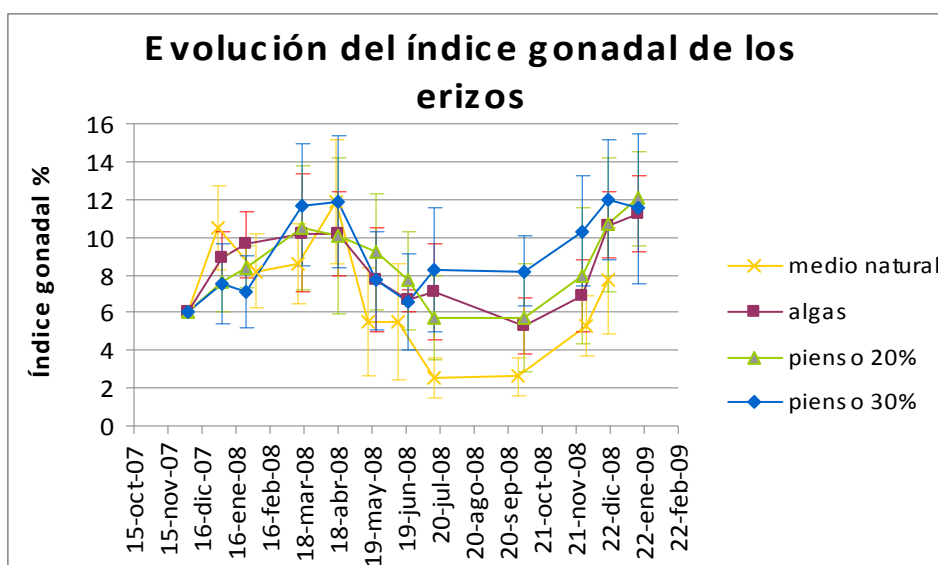


Figura 4-33.- Gráfico comparativo de la evolución del índice gonadal de los erizos con diferentes tipos de alimentación en relación al índice que presentan los erizos procedentes del medio natural.

Independientemente de la alimentación que se suministre a los erizos, podemos comprobar que el índice gonadal fluctúa a lo largo del año siguiendo la pauta que presenta el ciclo gonadal de *Paracentrotus lividus* en las costas de Galicia, es decir, observamos un pico donde el valor del IG es máximo en los meses de marzo y abril, después de los cuales tiene lugar el desove anual de los erizos a finales de la primavera o principios del verano, que tiene como consecuencia una disminución brusca de dicho índice; ésta se prolonga durante todo el periodo estival hasta el mes de septiembre, durante el cual los fagocitos nutritivos comienzan a almacenar sustancias de reserva dando lugar al inicio de la nueva vitelogénesis.

Es destacable el hecho de que tras el periodo de desove de la gónada, en los erizos procedentes del medio natural podemos observar una disminución considerable del I.G., pasando de un valor de 5,5 en el mes de junio a un valor mínimo anual de 2,57 en el mes de julio, del que no empezará a recuperarse progresivamente hasta el mes de septiembre en el que comienza a incrementarse el tamaño de la gónada debido al nuevo proceso de vitelogénesis; sin embargo podemos observar que en el caso de los erizos alimentados con el pienso del 30% no sólo no disminuye el valor del índice gonadal sino que aumenta, pasando de un valor de 6,56 en el mes de junio a un valor de 8,22 en julio, manteniéndose durante todo el periodo estival en un nivel más de tres veces superior al valor del I.G. obtenido en los erizos procedentes del medio natural; en el mes de septiembre se mantiene con un valor de 8,19 y empieza a su vez la recuperación con el nuevo proceso de vitelogénesis.

Los erizos alimentados con algas y con el pienso del 20% de contenido proteico presentan valores intermedios de su índice gonadal durante el verano, siendo éstos de 5,28 y 5,74 respectivamente en el mes de septiembre cuando se empiezan a recuperar a su vez.

Los valores del índice gonadal de los erizos procedentes del medio natural alcanzan su máximo valor (11,82) en el mes de abril. Curiosamente los erizos alimentados en la batea presentan un proceso vertiginoso de recuperación gonadal a partir de septiembre de 2008, alcanzando picos de 11,96 de índice gonadal en diciembre (pienso del 30%) y de 11,20 y 12,03 de IG en enero de 2009 (algas y pienso del 20% respectivamente).

Las experiencias sobre el índice gonadal en los erizos comerciales indican que el pienso del 30% tiene un efecto de incremento respecto a las otras dietas y a los individuos del medio natural, con un adelanto de un mes en el pico máximo con respecto al medio natural. Esto tiene un gran interés desde el punto de vista de la explotación comercial, con la posibilidad de utilizar este pienso durante un periodo corto de tiempo con el fin de incrementar el peso de las gónadas tras el periodo de desove que se corresponde con el ciclo natural de *Paracentrotus lividus*, permitiendo ampliar el periodo de comercialización y transformación de los erizos en las mejores condiciones de explotación.

4.4.3.2. Análisis estadístico de los datos.

El objetivo de este tratamiento estadístico de los datos es comparar el índice gonadal de los erizos del medio natural con los índices gonadales obtenidos con las otras tres dietas. Se presenta una tabla (4-49) resumen de los datos que contiene la información de los estadísticos descriptivos más relevantes:

Tabla 4-49.- Estadísticos descriptivos de los datos del IG obtenidos con erizos del medio natural y con erizos alimentados con 3 dietas.

Índice gonadal	Medio Natural	Algas	20%	30%
Mínimo:	1.242	1.983	0.826	2.257
1^{er} cuartil:	3.283	6.687	6.029	6.264
Mediana:	6.657	7.811	7.847	7.931
Media:	6.792	8.213	8.114	8.608
3^{er} cuartil:	9.258	9.973	10.019	10.813
Máximo:	18.403	16.405	16.711	16.683

Consideramos como variable continua el índice gonadal de los erizos y como variable explicativa el tipo de dieta. Para averiguar con qué tipo de dieta se obtiene un índice gonadal más elevado en los erizos calculamos el IG promedio en función de cada dieta y analizamos si existen o no diferencias entre ellas. Con un ANOVA (Análisis Of Variance) podríamos analizar si las dos variables (índice gonadal y tipo de dieta) son independientes o no, es decir, si obtenemos valores significativamente diferentes en el IG según el tipo de dieta suministrada a los erizos. Para realizar un ANOVA tenemos que comprobar que los datos cumplen el requisito de normalidad (tabla 4-50).

Tabla 4-50.- Resultado de las pruebas de normalidad realizadas para el IG de los erizos del medio natural y con 3 dietas.

Pruebas de normalidad para el índice gonadal						
Alimento	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Medio natural	,076	76	,200	,987	76	,616
Algas	,089	201	,001	,953	201	,000
20%	,100	95	,021	,967	95	,018
30%	,069	96	,200	,987	96	,436

En la tabla 4-50 se muestran las pruebas de normalidad. Para que los datos cumplan este requisito, el p -valor ha de ser ‘no significativo’ en los dos contrastes, es decir, $p > 0,05$. En este caso podemos asumir la no normalidad de la variable cuantitativa ‘índice gonadal’ en los grupos Algas y 20%. Al no cumplirse la prueba de normalidad para todos los grupos tenemos que emplear una prueba no paramétrica para realizar un contraste de hipótesis que evalúe hasta qué punto las medias del índice gonadal son diferentes. Realizamos el test de Kruskal-Wallis (tabla 4-51).

Tabla 4-51.- Resultado del test de Kruskal-Wallis para el índice gonadal de los erizos del medio natural y alimentados con 3 dietas.

Dietas	
Estadístico Chi-cuadrado	23.3508
Grados de libertad	3
p -valor	3.412e-05

El resultado del test de Kruskal-Wallis nos permite rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias, hay argumentos que relacionen el índice gonadal con los 4 tipos de dieta analizados. Para saber si todas son distintas tenemos que analizar las dietas dos a dos; observando los intervalos de confianza para la media en cada dieta (tabla 4-52) podemos intuir si la media de alguna de las dietas coincide:

Tabla 4-52.- Resultado del contraste de medias del IG en los erizos del medio natural y alimentados con 3 dietas.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Medio Natural	201	6,79	3,87	,27	6,25	7,33	1,24	18,40
Algas	76	8,21	2,62	,30	7,61	8,81	1,98	16,41
20%	96	8,11	3,15	,32	7,48	8,75	,83	16,71
30%	95	8,61	3,24	,33	7,95	9,27	2,26	16,68
Total	468	7,66	3,50	,16	7,35	7,98	,83	18,40

La dieta con pienso elaborado al 30% es la que produce erizos con mayor índice gonadal. Los erizos del medio natural son los que presentan un índice gonadal más bajo, y este grupo es totalmente diferente de los otros tres, su intervalo de confianza es muy inferior y no interseca ni contiene a ninguno. Los intervalos de confianza de la dieta de algas y de los piensos al 20 y al 30% son muy superponibles, para saber si son distintas las medias de las tres dietas los comparamos dos a dos:

Comparación algas con pienso al 20%:

Planteamos un contraste de hipótesis en el que H_0 , significa que las medias para ambas dietas son iguales y H_1 que son distintas. Las dos poblaciones de erizos, los alimentados con algas y los alimentados con pienso al 20%, siguen distribuciones normales. Tras aplicar el test de normalidad de Shapiro Wilk, el p -valor en ambos casos es mayor de 0,05. Para contrastar si las medias en ambas dietas son iguales o no, aplicamos el t.test. El resultado del test es un valor del estadístico de contraste ($t = 0,2245$), de los grados de libertad ($df = 169,569$), y del p -valor = 0,8227. Dado que el p -valor es superior a 0,05, ya podemos concluir que tenemos evidencias en los datos para afirmar con un 95 % de confianza que las medias de las dos dietas son iguales.

Comparación algas con pienso al 30%:

Procedemos de modo análogo al caso anterior y obtenemos en este caso el valor del estadístico de contraste ($t = -0,8812$), los grados de libertad ($df = 168,974$), y el p -valor

= 0,3794. En este caso el p -valor vuelve a ser superior a 0,05, por lo que podemos afirmar que las medias de las dietas de algas y de pienso al 30% también son iguales.

Comparación pienso al 20% con pienso al 30%:

En este caso los resultados del test nos dan un valor del estadístico de contraste ($t = -1,0675$), los grados de libertad ($df = 188,726$), y el p -valor ($p\text{-value} = 0,2871$). Dado que es superior a 0,05, ya podemos concluir que tenemos evidencias en los datos para afirmar con un 95 % de confianza que la media de ambas dietas son iguales.

Las medias del índice gonadal de los erizos del medio natural y de los erizos alimentados con 3 dietas son distintas pero al compararlas dos a dos el resultado es que las 3 dietas distintas al medio natural (promedio = 6,79) proporcionan índices gonadales medios iguales (promedio_{algas} = 8,21; promedio_{20%} = 8,11; promedio_{30%} = 8,61). Esto significa que alimentando a los erizos con cualquiera de las tres dietas obtendremos un incremento del índice gonadal de los erizos con respecto al IG de los erizos del medio natural, sin embargo obtendremos el mismo resultado independientemente de la dieta que suministremos, con lo cual no sería rentable la fabricación de piensos en el laboratorio. No obstante, como se comentaba anteriormente, observando la figura 4-33 vemos que hay un periodo del ciclo anual de *P. lividus*, justo después del periodo de desove (20 julio-20 septiembre) en el que el índice gonadal de los erizos alimentados con pienso del 30% aumenta, pasa de un valor de 6,56 en el mes de junio a un valor de 8,22 en julio y se mantiene durante todo el verano en un nivel de más del triple que el valor del I.G. que presentan los erizos procedentes del medio natural; esta circunstancia permitiría alimentar a los erizos recolectados en el medio natural con un pienso elaborado en el laboratorio durante un periodo corto de tiempo antes del desove de las gónadas con el fin de mantener este índice gonadal en niveles elevados durante dos meses más y prolongar así considerablemente el tiempo de comercialización de los erizos.

4.4.3.3. Engorde de gónadas.

A continuación se presenta la gráfica que resume los resultados obtenidos con cada una de las experiencias bimensuales donde se puede ver la evolución del índice gonadal en cada caso (figura 4-34).

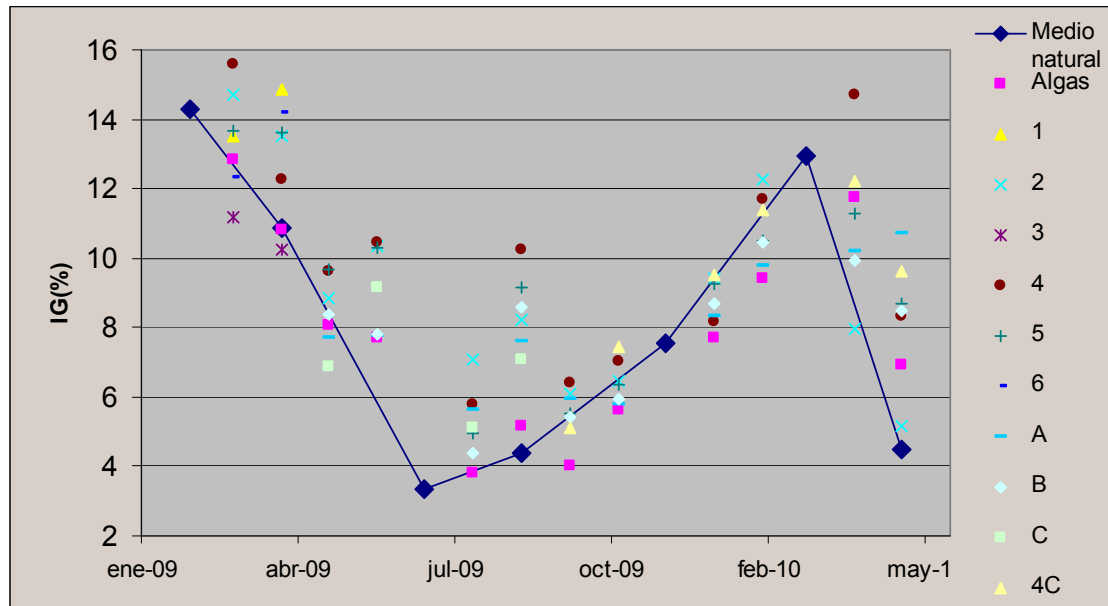


Figura 4-34.- Índice gonadal de erizos comerciales alimentados con diferentes dietas experimentales y algas, respecto al medio natural.

En esta figura se pueden ver las 6 experiencias realizadas, de 2 meses cada una, con un total de 10 dietas experimentales y una dieta de algas. Mensualmente se determinó para cada experimento el IG obtenido (puntos de diferentes colores) y se comparó con el IG del medio natural obtenido al comienzo de cada experimento.

Se representan en esta figura las medidas del índice gonadal de los erizos obtenidas durante los seis experimentos bimensuales, así como la evolución del IG de los erizos del medio natural. Los altos valores iniciales del IG de los erizos del medio natural del primer experimento corresponden al máximo desarrollo gonadal anual. Al comienzo del desove, se puede observar un descenso general del IG en la primera medida (21 de marzo), excepto en el caso de las dietas 2 y 4, en las que se aumenta su valor. Las dietas de algas, la 3 y la 6, son las que sufren un mayor descenso del IG, quedando por debajo

del IG de los erizos del medio natural. En el mes siguiente (18 abril), la dieta 3 y la de algas siguen bajando mientras que el resto de las dietas aumentan el IG, excepto la dieta 4 (que tenía el máximo valor el mes anterior) que ahora desciende aunque sigue manteniéndose por encima de los valores del medio natural.

En el segundo experimento se observa como durante el primer mes el IG sigue bajando en todos los casos, manteniendo los mejores valores los erizos con las dietas similares a la experiencia anterior. Las dietas nuevas (excepto la C) siguen teniendo valores superiores al medio natural. Durante el segundo mes aumentan los valores de las dietas 5, 4, 2 y C, manteniéndose las dietas A y B con valores muy similares a los de erizos alimentados con algas.

En la tercera experiencia vemos el efecto de la puesta sobre el IG, podemos observar como en los meses de julio a septiembre se presenta el mínimo IG anual (3,33-4,4%) en el medio natural, correspondiente a la etapa previa a un nuevo ciclo reproductor, que contrasta con el aumento del IG observado en todas las dietas, alcanzando un valor 2,5 veces superior al del medio natural en el caso de la dieta 4; las dietas 2, B y 5 alcanzan también el doble del IG comparadas con los erizos del medio natural, las dietas A y C presentan un incremento menor, observándose el peor comportamiento del IG en el caso de las algas (5,15%).

En el siguiente experimento vemos cómo se incrementa nuevamente el IG de los erizos ya que se corresponde con un período de acumulación de sustancias de reserva en la gónada, comienza de nuevo la vitelogénesis dentro del ciclo anual de *Paracentrotus lividus*. En esta experiencia podemos observar que las dietas que mejor funcionan son la 4 y la 4C (diseñada a partir de la dieta C antigua), los individuos alimentados con estas dietas mantienen su IG ligeramente mayor que los erizos del medio natural, los IG más bajos se corresponden con las dietas A, B y con los individuos alimentados con algas.

El quinto experimento bimensual realizado se corresponde con la época de mayor crecimiento tanto somático como gonadal de los erizos que se produce durante los meses de invierno antes del desove. Como podemos observar, sólo las dietas 4, 4C y 2 presentan valores de crecimiento ligeramente superiores a los valores del medio natural.

El último experimento realizado representa nuevamente el inicio progresivo de la época de desove. Todos los erizos alimentados con las dietas suministradas, exceptuando la dieta 2 y la de algas, presentan valores de índice gonadal por encima de los datos obtenidos en erizos del medio natural; como se puede observar, la dieta que mejor funciona en cuanto a mantenimiento de los valores del índice gonadal una vez que comienza el período de desove es la dieta A, el IG de los erizos alimentados con esta dieta desciende ligeramente en el mes de abril para volver a recuperarse en el mes de mayo, alcanzando un valor de 10,72.

Las diferencias observadas entre los erizos mantenidos en el sistema de cultivo y los del medio natural, en los meses de junio y julio, podrían ser debidas al acceso de los erizos que están confinados en la batea a recursos alimenticios abundantes, haciendo que presenten un incremento del IG incluso fuera del periodo reproductivo (Ebert, 1966; Byrne, 1990; Fernández, 1998; Fernández & Boudouresque, 2000).

Cabe destacar que el IG del 15.56% obtenido con una de nuestras dietas (Fig. 4-34, experimento 1, dieta 4) es superior al de otros estudios de alimentación en erizos grandes tanto en Escocia, donde Cook & Kelly (2007) obtuvieron un 10,4%, como en Francia (Fernández y Boudouresque, 1998). Los valores de IG conseguidos en esta experiencia son mayores que los habituales en erizos salvajes de Galicia (12,2%) (Montero-Torreiro y García-Martínez, 2003).

4.4.3.4. Análisis estadístico de los datos.

Al realizar el tratamiento estadístico de los datos del índice gonadal obtenidos con cada dieta en los 6 experimentos, pretendemos comparar los índices gonadales finales de los erizos, con el fin de ver si son significativamente distintos en función de las dietas suministradas, partiendo del índice gonadal inicial de los erizos del medio natural.

Experimento 1:

Se presenta una tabla resumen (tabla 4-53) de los datos promedio del índice gonadal de los erizos del medio natural y de los erizos alimentados con las otras 7 dietas.

Planteamos un contraste de hipótesis en el que H_0 significa que las medias para ambas dietas (medio natural con el resto) son iguales y H_1 que son distintas. En la siguiente tabla se muestran los resultados de los p -valores en la segunda fila. En el caso de que el p -valor sea superior a 0.05, ya podemos concluir que tenemos evidencias en los datos para afirmar con un 95 % de confianza que las medias de ambas dietas son iguales, por el contrario, si el p -valor < 0.05 , las medias de ambas dietas serán significativamente distintas.

Tabla 4-53.- Resultado del contraste de hipótesis entre las medias de IG de los erizos del primer experimento.

Experimento 1	Medio Natural	Algas	Dieta1	Dieta2	Dieta3	Dieta4	Dieta5	Dieta6
Media:	11,23	10,82	14,84	13,49	10,27	12,28	13,59	14,19
p-valor		0,695	0,007	0,083	0,442	0,314	0,069	0,009

Una vez más la variable continua o variable respuesta es el índice gonadal, la variable tipo factor vuelve a ser el tipo de dieta. La dieta 3 y la dieta de Algas presentan un valor de índice gonadal menor que el de los erizos procedentes del medio natural. Por el contrario las dietas: 4, 2, 5, 6 y 1 tienen un valor de IG superior al de los erizos del medio natural. Observando los valores del p -valor obtenidos tras el contraste de hipótesis, podemos rechazar la hipótesis nula, hay pruebas que relacionan el índice gonadal con los 8 tipos de dieta analizados.

Los IG de los erizos alimentados con las dietas 2, 3, 4, 5, y Algas no son estadísticamente diferentes (p -valor > 0.05) de los IG de los erizos del medio natural, su media no es estadísticamente significativa. Las dietas: 1 y 6 son las únicas cuya media es estadísticamente distinta que la media del IG de los erizos procedentes del medio natural, (p -valor < 0.05).

Experimento 2:

A continuación se presenta una tabla resumen (tabla 4-54) de los datos promedio del índice gonadal de los erizos procedentes del medio natural y del IG de los erizos alimentados con las otras 7 dietas.

Volvemos a hacer un contraste de hipótesis (tabla 4-54) en el que H_0 significa que las medias para ambas dietas (medio natural con cada una de las dietas artificiales) son iguales y H_1 significaría que las medias son distintas. Una vez más, si el p -valor es superior a 0.05, podremos afirmar que las medias de las dietas son iguales estadísticamente, en caso contrario serán distintas.

Tabla 4-54.- Resultado del contraste de hipótesis entre las medias de IG de los erizos del segundo experimento.

Experiencia 2	Medio Natural	Algas	Dieta2	Dieta4	Dieta5	DietaA	DietaB	DietaC
Media:	4,34	7,72	10,34	10,44	10,28	7,77	7,83	9,15
p-valor:		6,53E-05	6,82E-06	1,66E-06	2,68E-06	3,08E-04	7,30E-05	1,87E-05

En este caso todas las dietas incrementan de manera significativa el valor del índice gonadal. El p -valor de todas ellas es menor que 0.05, las medias del IG son significativamente distintas de la media de IG de los erizos procedentes del medio natural. Las dietas más eficaces incrementando el índice gonadal de los erizos son la 2 y la 4.

Experimento 3:

A continuación se presenta la tabla 4-55 con los datos de las medias y los p -valores obtenidos al realizar el contraste de hipótesis en la tercera experiencia.

Tabla 4-55.- Resultado del contraste de hipótesis entre las medias de IG de los erizos del tercer experimento.

Experiencia 3	Medio Natural	Algas	Dieta2	Dieta4	Dieta5	DietaA	DietaB	DietaC
Media:	4,19	5,15	8,23	10,27	9,17	7,59	8,58	7,06
p-valor:		0,193	3,13E-04	8,12E-06	1,19E-04	0,001	8,20E-05	0,002

Todas las dietas suministradas a los erizos aumentan el valor del índice gonadal con respecto a los erizos del medio natural, sin embargo, en el caso de la dieta de Algas, este aumento no es estadísticamente significativo, $p\text{-valor} > 0.05$, la media de los IG de los erizos alimentados con Algas no se diferencia de la media de los IG de los erizos del medio natural.

Experimento 4:

En la tabla 4-56 aparecen los valores medios del índice gonadal con las distintas dietas, así como los p -valores resultantes del contraste de hipótesis.

Tabla 4-56.- Resultado del contraste de hipótesis entre las medias de IG de los erizos del cuarto experimento.

Experiencia 4	Medio Natural	Algas	Dieta2	Dieta4	Dieta4C	Dieta5	DietaA	DietaB
Media:	6,62	5,62	6,46	7,04	7,47	6,35	5,80	5,93
p-valor:		0,072	0,828	0,573	0,329	0,714	0,127	0,304

Observando los valores medios del IG vemos que las dietas: Algas, A, B, 5 y 2 presentan un tamaño menor del índice gonadal que los erizos procedentes del medio natural. Por el contrario las dietas 4 y 4C aumentan su valor.

Sin embargo debido a los valores que obtenemos al realizar el contraste de hipótesis podemos afirmar que las medias de todas las dietas son estadísticamente iguales ($p\text{-valor} > 0.05$) que la dieta del medio natural.

Experimento 5:

Tabla 4-57.- Resultado del contraste de hipótesis entre las medias de IG de los erizos del quinto experimento.

Experiencia 5	Medio Natural	Algas	Dieta2	Dieta4	Dieta4C	Dieta5	DietaA	DietaB
Media:	10,97	9,43	12,27	11,71	11,36	10,48	9,79	10,46
p-valor:		0,023	0,223	0,375	0,695	0,666	0,181	0,559

El tamaño del índice gonadal de los erizos (tabla 4-57) es menor que el IG de los erizos del medio natural con las dietas: Algas, A, B y 5; sin embargo los erizos alimentados con las dietas: 4C, 4 y 2 presentan un IG más elevado.

Una vez realizado el contraste de hipótesis vemos que las medias de todas las dietas son estadísticamente iguales que la media del medio natural, excepto la dieta de Algas (p -valor = $0,023 < 0,05$) que es la que presenta el índice gonadal más bajo. La dieta de Algas es significativamente distinta a las demás porque la media del IG de los erizos alimentados con ella es estadísticamente menor que las del resto de dietas. Hay que tener en cuenta que el experimento 5 se desarrolla durante una época del año que coincide con una etapa de recuperación gonadal dentro del ciclo anual de *P. lividus*.

Experimento 6:

Tabla 4-58.- Resultado del contraste de hipótesis entre las medias de IG de los erizos del sexto experimento.

Experiencia 6	Medio Natural	Algas	Dieta2	Dieta4	Dieta4C	Dieta5	DietaA	DietaB
Media:	4,49	6,91	3,87	8,34	9,64	8,69	10,72	8,47
p-valor:		0,013	0,745	0,003	0,018	0,067	0,008	0,015

Exceptuando la Dieta 2, con todas las dietas se consigue aumentar el valor medio del IG de los erizos (tabla 4-58), el mayor aumento se produce con la Dieta A. Las dietas 2 y 5 presentan una media de IG estadísticamente igual que la de los erizos del medio natural. Para las demás dietas se obtiene un p -valor $< 0,05$ al realizar el contraste de hipótesis,

por lo que se puede afirmar que son significativamente distintas a la dieta del Medio Natural.

4.4.4. Conclusiones.

1. Las dietas diseñadas en el laboratorio para engorde de gónadas en la experiencia preliminar cumplieron su objetivo, siendo la que mejor funciona la dieta del 30% de contenido proteico, ya que se obtuvieron valores de índice gonadal 2,5 veces superiores a los de los erizos del medio natural.

2. El engorde de erizos con la dieta del 30% durante un periodo previo al desove permitiría ampliar el periodo de comercialización y transformación de los mismos.

3. De las 10 dietas diseñadas para la experiencia de engorde de gónadas, las que mejor funcionan son las dietas 4 y 4c. La alimentación de erizos con estas dietas nos permitiría mantener su IG en valores comerciales durante al menos dos meses después de que se produzca el desove de los erizos en el medio natural, así como una recuperación muy rápida de este índice al comenzar la vitelogénesis (233% de incremento del IG con la dieta 4 en el mes de septiembre).

4.5. Análisis preliminar de la diferenciación genética de poblaciones de erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, a partir de RAPDs (Random Amplified Polimorphyc DNA).

4.5.1. Objetivo.

Determinar la diversidad genética de distintas poblaciones de *Paracentrotus lividus* mediante un estudio de genética poblacional a partir de muestras de las tres comunidades autónomas, Galicia, Asturias y Canarias, con el fin evaluar la posible utilización de erizos de Asturias y Galicia para realizar repoblaciones en Canarias.

4.5.2. Materiales y métodos.

4.5.2.1. Muestreo.

Las localidades donde se recogieron los erizos para realizar este experimento aparecen detalladas en el apartado 3.2.4.1. de Materiales y Métodos. Para su recolección y transporte se actuó como se describe en el apartado 3.2.1 del mismo capítulo. Una vez en el laboratorio se procedió a abrir los erizos y a preservar las gónadas en etanol para evitar su degradación.

4.5.2.2. Análisis de datos.

Para realizar el análisis con RAPDs se seleccionaron las muestras que presentaban menor degradación y cuyo estado de conservación era similar entre sí. Una vez que visualizamos los productos amplificados en el gel de agarosa se observan una serie de bandas correspondientes a cada muestra, éstas se encuentran a distintas alturas dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN de la muestra analizada. Se realizaron agrupamientos de las secuencias amplificadas con cada cebador utilizando el software Quantity One (Bio-Rad), a partir de los cuales se construyeron dendrogramas para cada cebador, basados en la presencia o ausencia de bandas compartidas entre muestras, mediante el método de agrupamiento de pares con media aritmética no

ponderada UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) (Sneath & Sokal, 1973). En el método UPGMA las secuencias, llamadas OTUs (unidades taxonómicas operativas) son tratadas como taxones, las muestras con patrones de bandas similares se agrupan por pares, se recalcula la matriz de distancias y se repite el proceso secuencialmente hasta que todas las muestras se encuentran conectadas a un único grupo o ancestro común. El resultado es un dendrograma enraizado donde se representan las relaciones filogenéticas más probables entre individuos de las poblaciones analizadas.

4.5.3. Resultados y discusión.

Se han observado diferentes grados de degradación en las muestras aisladas debido a condiciones también diferentes y no adecuadas de preservación de las mismas (Fig. 4-35).

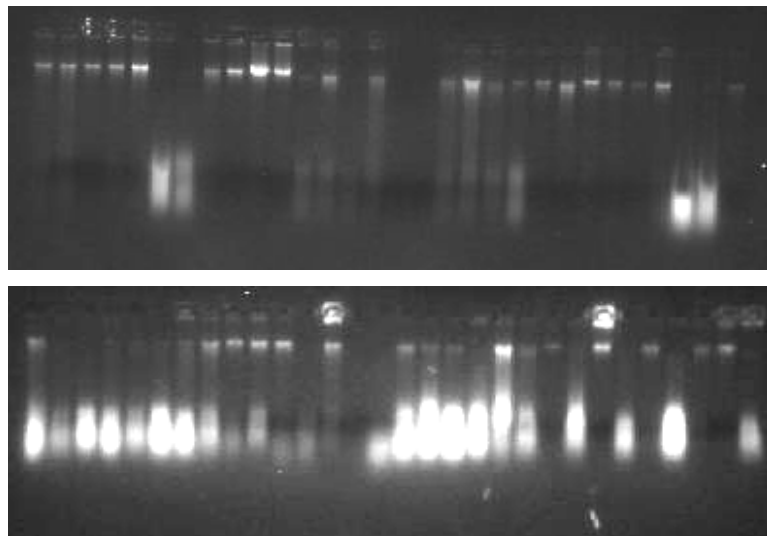


Figura 4-35.- Juego de ADNs aislados a partir de las muestras obtenidas.

En la figura 4-35 se aprecian bandas en las que el ADN se encuentra totalmente íntegro, como se puede ver en las muestras 10 y 11, mientras en otros casos está casi totalmente degradado (muestras 16 y 17).

A continuación se muestran las fotografías de los patrones de bandas de RAPDs obtenidos al amplificarlos con los distintos cebadores (Figuras 4-36 a 4-41).

En la figura 4-36 se observan distintos patrones de bandas, podemos ver que éstas se distribuyen a distintas alturas dependiendo del tamaño del fragmento amplificado. Para cada genotipo de *P. lividus* se generó un conjunto de patrones de bandas característico o huella genética que lo diferencia de los demás y a su vez permite establecer rangos de similitud entre los distintos genotipos con el fin de agruparlos siguiendo el método UPGMA.

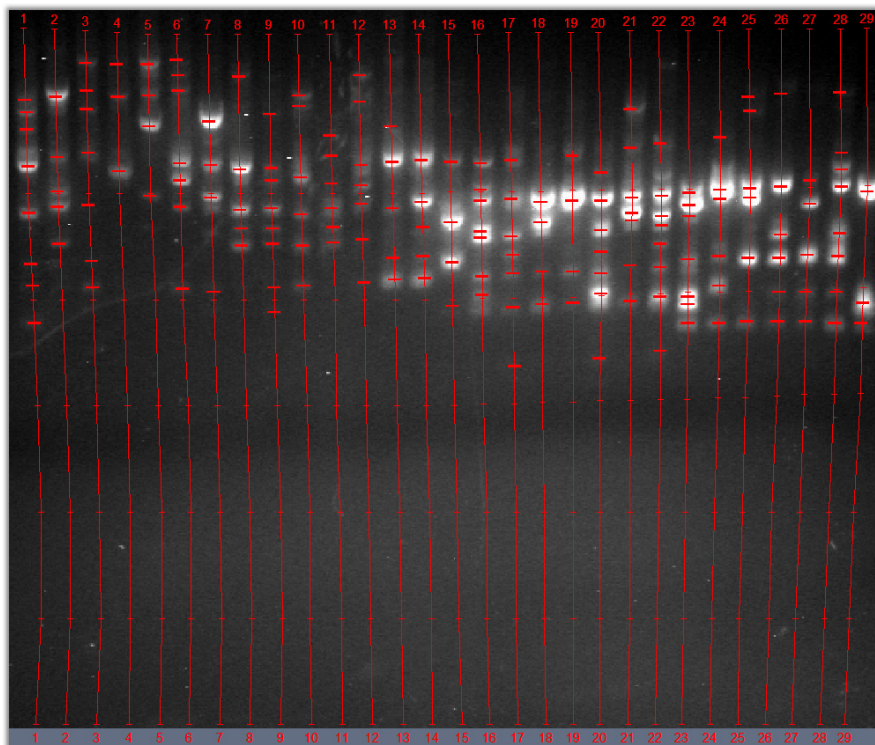


Figura 4-36.- Patrones de bandas de RAPDs tras la amplificación con el cebador 1. (Muestras analizadas de la península Ibérica 1-16, Canarias:17-29).

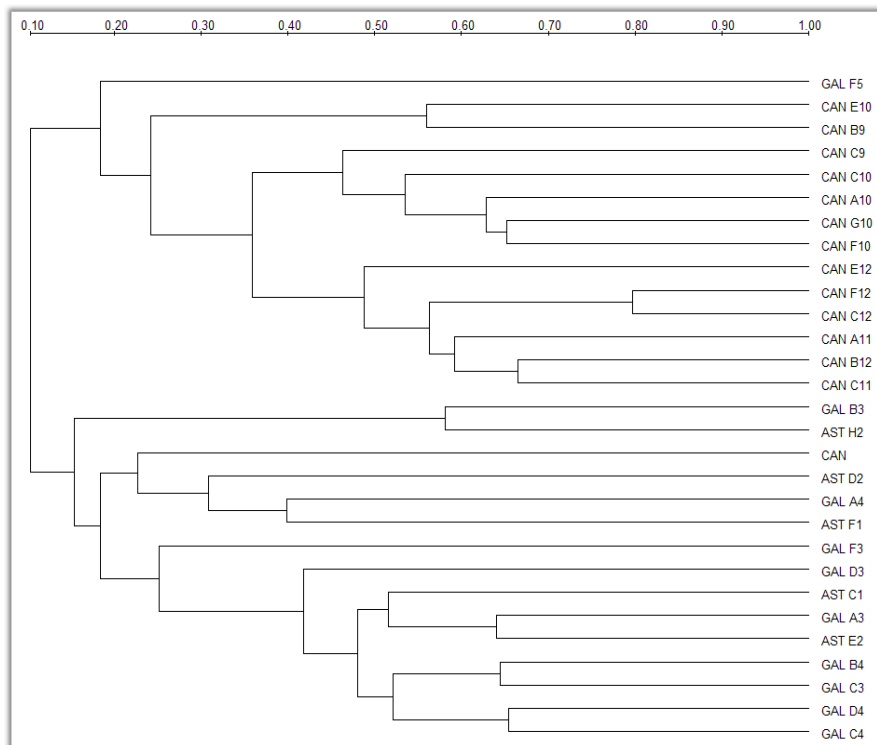


Figura 4-37.- Árbol de UPGMA mostrando las relaciones de similitud entre los patrones de RAPDs obtenidos con el cebador 1. Abreviaturas: GAL-Galicia, AST-Asturias, CAN-Canarias. La numeración de las muestras se corresponde con la que aparece en la tabla 3-2 de Materiales y Métodos. Cada rama representa una OTU.

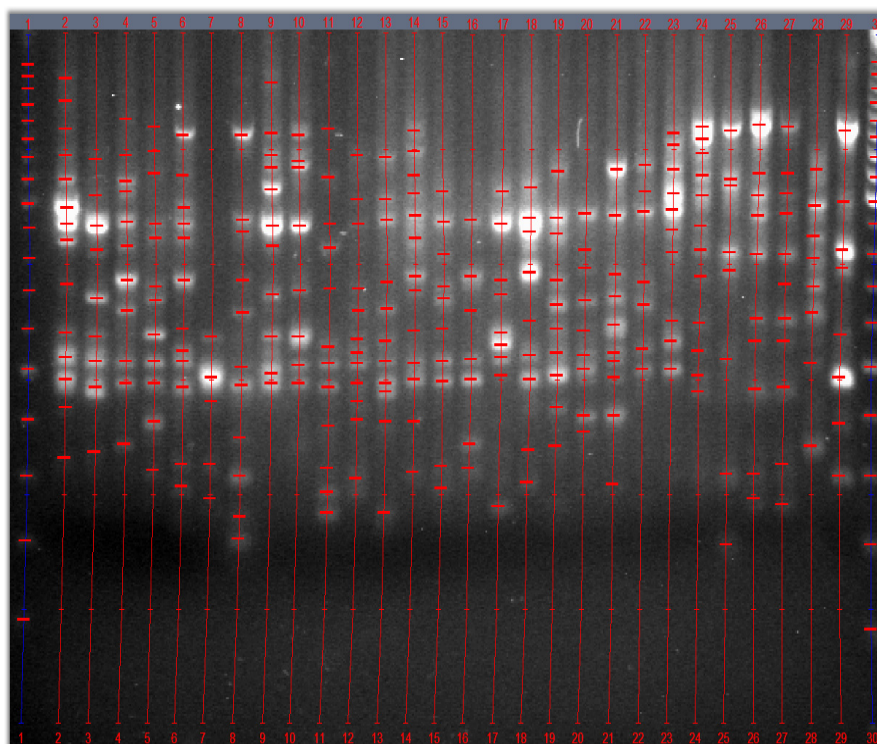


Figura 4-38.- Patrones de bandas de RAPDs tras la amplificación con el cebador 2. (Muestras analizadas de la península Ibérica 2-16, Canarias: 17-29, Marcador 100pb: 1 y 30).

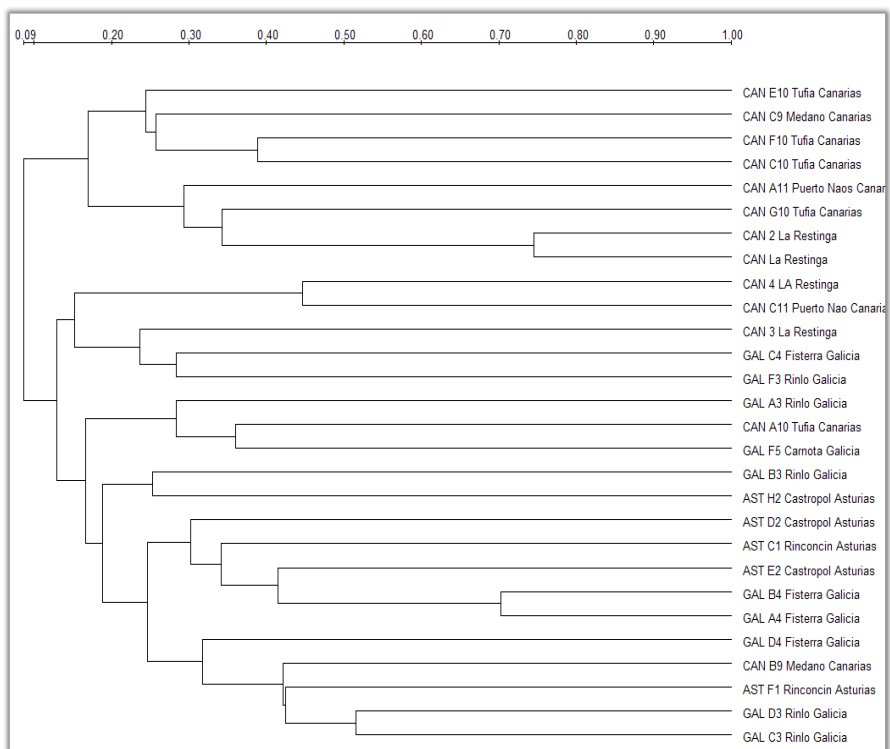


Figura 4-39.- Árbol de UPGMA mostrando las relaciones de similitud entre los patrones de RAPDs obtenidos con el cebador 2.

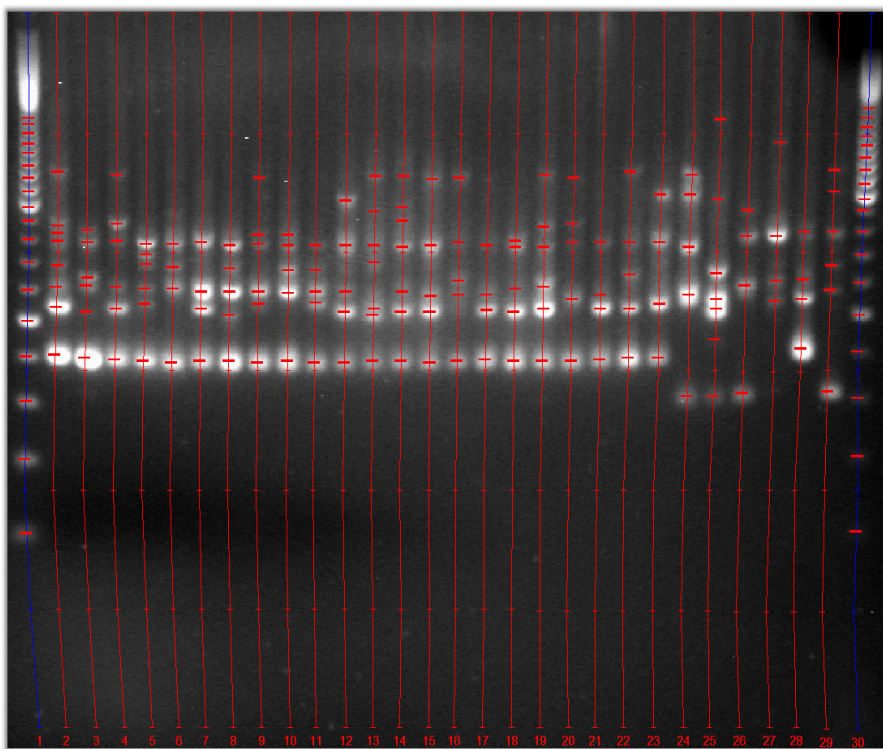


Figura 4-40.- Patrones de bandas de RAPDs tras la amplificación con el cebador 3. (Muestras analizadas de la península Ibérica 2-16, Canarias: 17-29, marcador 100pb: 1 y 30).

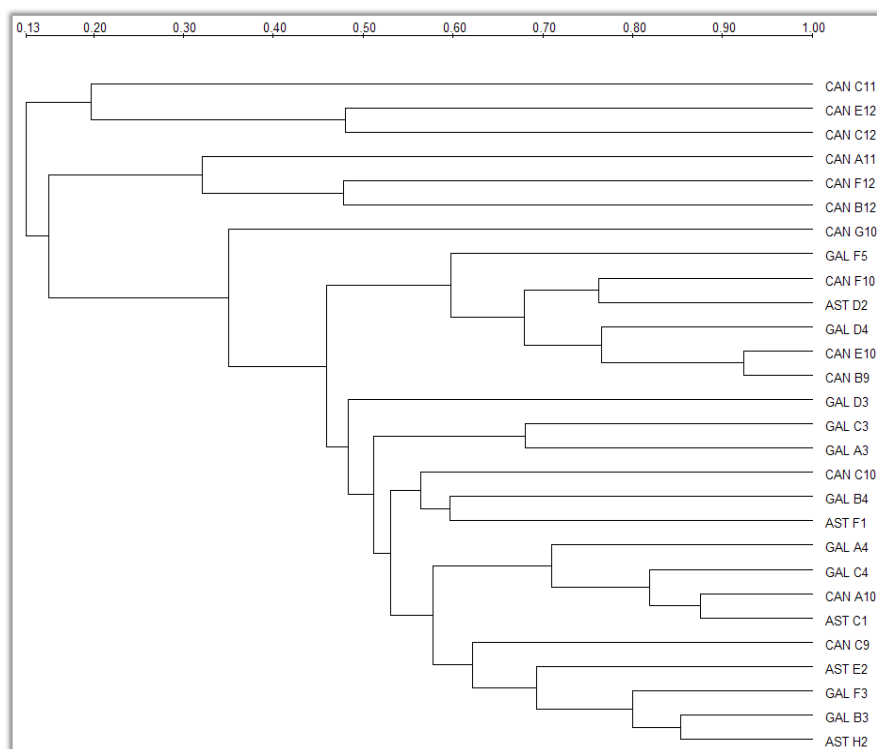


Figura 4-41.- Árbol de UPGMA mostrando las relaciones de similitud entre los patrones de RAPDs obtenidos con el cebador 3.

La resolución de los fragmentos amplificados con el cebador 1 para RAPDs muestra una clara diferenciación entre los patrones de bandas de las muestras de Canarias respecto a los de la península Ibérica (Figura 4-36). Como resultado del análisis comparativo de las bandas detectadas y la reconstrucción gráfica de la similitud entre patrones mediante UPGMA, se observan dos grupos divergentes (Figura 4-37). El grupo superior contiene casi exclusivamente individuos de Canarias, mientras que el grupo inferior contiene las muestras peninsulares.

De forma similar los árboles obtenidos con los cebadores 2 y 3 muestran que las muestras de Canarias se agrupan preferentemente en una rama divergente de la rama que agrupa a las muestras peninsulares.

Estos resultados son esperables bajo una restricción del flujo génico entre las poblaciones peninsulares y la población canaria. Sin embargo, el análisis con RAPDs está basado en similitud entre muestras y no necesariamente refleja relaciones

filogenéticas. Por ello, con el fin de explorar estos resultados con más detalle se decidió estudiar las poblaciones mediante secuenciación del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI).

4.5.4. Conclusiones.

1. El análisis de los fragmentos amplificados con tres cebadores para RAPDs muestra una clara diferenciación entre las muestras canarias y peninsulares.
2. Se recomienda al equipo canario del proyecto que no realice sus repoblaciones con erizos peninsulares, tal como estaba previsto, y que produzca sus propios juveniles con reproductores de la zona.
3. Se decide explorar estos resultados con más detalle, estudiando las poblaciones mediante secuenciación del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI).

4.6. Estudio de poblaciones de *P. lividus* mediante secuenciación del gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI).

4.6.1. Objetivo.

Caracterización genética de muestras de distintas poblaciones de *Paracentrotus lividus* mediante el estudio de un fragmento del gen mitocondrial COI, con el fin de determinar la existencia de barreras al flujo génico y proporcionar información para la gestión de este recurso pesquero.

4.6.2. Materiales y métodos.

Las muestras de la población La Restinga de Canarias no se secuenciaron por estar mal preservadas y por tanto muy degradado su ADN. Las muestras de Puerto Naos no se incluyeron en el estudio debido a que se produjo un error de identificación y sólo una secuencia de esta población correspondía a *P. lividus*, el resto fueron extraídas de otra especie de erizos, *Arbacia lixula*.

4.6.2.1. Electroforesis y detección de los productos de secuenciación.

Antes de llevar a cabo la electroforesis es necesario eliminar los terminadores marcados fluorescentemente no incorporados del BigDye terminator y evitar así interferencias en la secuenciación. Se aplicó el protocolo descrito en Montage SEQ96-Sequencing Wash Solution (Millipore, Bedford, MA), que empleando una bomba de vacío filtra los productos de secuenciación con la solución de lavado, éstos quedan purificados en la placa y se resuspenden posteriormente con la Solución de Inyección; este protocolo requiere muy poco tiempo, además no es necesaria la centrifugación.

Los productos de extensión fluorescentes se separaron mediante electroforesis y se detectaron utilizando un secuenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems). Finalmente se llevó a cabo una revisión visual de los electroferogramas obtenidos con el fin de corregir cualquier posible error en la lectura de los nucleótidos y un alineamiento de las secuencias obtenidas usando para ello el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1994). Una vez alineadas las secuencias se revisaron manualmente con el editor de secuencias de Bioedit (Hall, 1999) y se recortaron los nucleótidos extremos de las secuencias para que todas tuvieran la misma longitud (la de la secuencia más corta).

4.6.2.2. Caracterización de secuencias.

Una vez construido el alineamiento definitivo usamos la herramienta “DNA to haplotype collapse and convert” que encontramos en el software FABOX 1.40 (www.birc.au.dk). Esta herramienta nos permite colapsar las secuencias en haplotipos y guardar el resultado en formato ARP.

El número total de mutaciones, el número de haplotipos y la diversidad haplotípica y nucleotídica fueron calculados con ayuda del programa DnaSP v. 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). La inferencia filogenética se realizó mediante análisis basados en el criterio de distancias genéticas y en análisis de parsimonia, empleando para ello los programas Arlequin 3.1.1. (Excoffier *et al.*, 2005) y Network 4.6.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999) respectivamente.

El modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para analizar nuestros datos lo calculamos empleando el programa jModeltest versión 0.1.1. (Posada, 2008). Basándonos en la estrategia de selección AIC (Akaike Information Criterion), obtuvimos que el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado a nuestras secuencias es la distancia de Tamura-Nei o TMN (Tamura & Nei, 1993). Este modelo tiene en cuenta la heterogeneidad en las frecuencias nucleotídicas de las secuencias, así como las diferentes tasas de sustitución transicional que presentan las bases purínicas y pirimidínicas (Tamura & Nei, 1993). Obtenemos un valor de la distribución gamma de 0.1. Este valor corrige la diferencia existente entre las tasas de sustitución nucleotídica de los diferentes sitios (Tamura & Nei, 1993).

Con el programa Arlequin 3.1.1. (Excoffier *et al.*, 2005) realizamos comparaciones entre pares de poblaciones con 10.000 permutaciones para obtener los índices de fijación F_{ST} (Wright 1943, 1951, 1965) y de diferenciación genética (Φ_{ST}) (Excoffier *et al.*, 1992). Realizamos el análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Cockerham, 1969, 1973; Weir and Cockerham 1984; Excoffier *et al.*, 1992) para averiguar la distribución de la varianza genética poblacional, para el cual se probaron diferentes combinaciones entre grupos de poblaciones (tabla 4-59), además de calcular la varianza entre las poblaciones sin agrupar.

Tabla 4-59.- Combinaciones de grupos de poblaciones para el análisis de la varianza molecular.
Aguño: 1, Carnota: 2, Castropol: 3, Fisterra: 4, Rinlo: 5, Rinconcín: 6, Tufia: 7, Médano: 8.

Combinaciones	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Península y Canarias	1, 2, 3, 4, 5, 6	7,8	
Galicia, Asturias y Canarias	1, 2, 3, 4	5,6	7,8
Atlántico, Cantábrico y Canarias	1, 2, 3	4, 5, 6	7, 8

4.6.2.3. Diversidad haplotípica.

Con el fin de realizar un estudio de las relaciones entre haplotipos de *Paracentrotus lividus* en una zona geográfica más amplia, que abarcaría 6 poblaciones del Mediterráneo, 5 poblaciones de otras zonas del Atlántico y una de Canarias además de las poblaciones de Galicia, Asturias y Canarias estudiadas por nosotros, buscamos en la base de datos del GenBank las secuencias obtenidas en el trabajo de Durán *et al.*, 2004, con números de acceso AY630792-AY630981. Estas secuencias de 644 pares de bases corresponden a 127 individuos de los cuales 62 provienen de poblaciones del Mediterráneo, 54 de poblaciones atlánticas y 11 de Tenerife. Posteriormente realizamos un alineamiento conjunto después de ajustar estas secuencias al tamaño de las nuestras. Para el análisis estadístico de la parsimonia y la representación de las relaciones entre los haplotipos de las distintas zonas se utilizó el programa Network 4.6.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

4.6.3. Resultados y discusión.

4.6.3.1. Estructura poblacional.

El fragmento amplificado está formado por 557 pares de bases (Fig. 4-42) correspondientes al gen COI (citocromo c oxidasa subunidad I) del ADN mitocondrial de *Paracentrotus lividus* (Durán *et al.*, 2004).

Las 76 secuencias procedentes de individuos de 8 poblaciones de Galicia, Asturias y Canarias (Tabla 4-60) se colapsaron en 23 haplotipos únicos con 22 sitios variables.

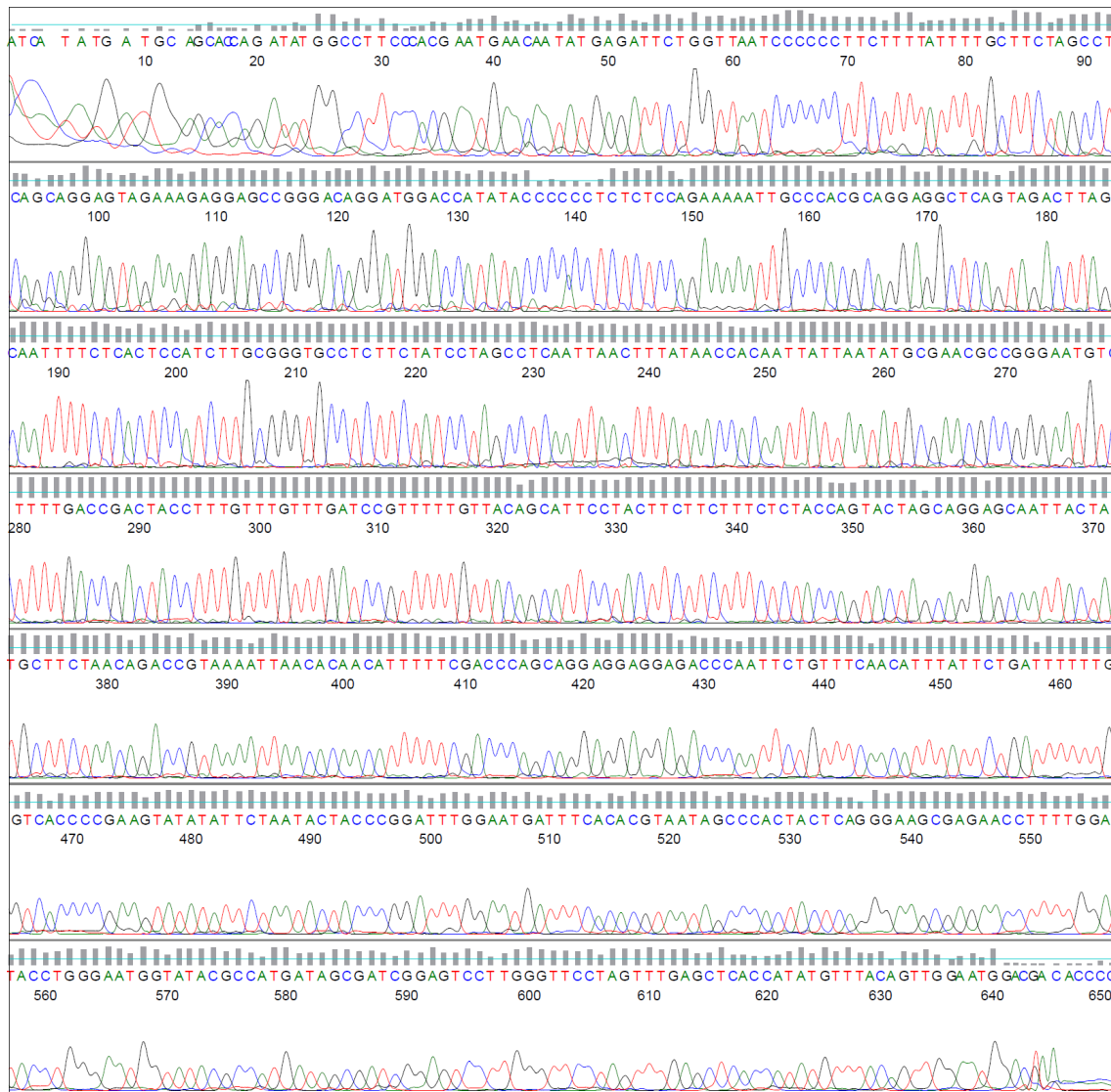


Figura 4-42.- Electroferograma de una de las secuencias de erizo (fragmento de la COI de ADN mitocondrial).

En la tabla 4-60 se puede ver que los valores de diversidad haplotípica oscilan entre 0,8333 en las poblaciones de Tufia o Carnota y 0,9451 en Aguiño, mientras los valores de diversidad nucleotídica varían desde 0,002590 en Tufia hasta 0,006463 en Finisterre. Se obtienen valores elevados de diversidad haplotípica en contraposición a los valores reducidos de diversidad nucleotídica en todas las poblaciones. Este fenómeno, que se observa frecuentemente en otras poblaciones de equinodermos (Palumbi & Wilson, 1990; Debenham *et al.*, 2000; Uthicke & Benzie, 2003) y otros organismos invertebrados marinos (Palero *et al.*, 2008), generalmente se atribuye a que una

población con un tamaño relativamente pequeño sufre una explosión demográfica (Watterson, 1984) expandiéndose y colonizando nuevos territorios; durante este proceso se producen mutaciones que favorecen la supervivencia de la especie en las condiciones ambientales del nuevo hábitat, con el tiempo estas mutaciones se fijan dando lugar a nuevos haplotipos característicos de la nueva zona habitada.

Tabla 4-60.- Índices de diversidad de las poblaciones de erizo de la península Ibérica y Canarias. Número de secuencias analizadas (N), número de haplotipos existentes en cada población (Nh), número de sitios polimórficos (Np) y la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) con su desviación estándar.

Población	Código	N	Nh	Np	h	π
Península						
Rinconcín	1	10	7	9	0.9111 +/- 0.0773	0.005458 +/- 0.003708
Castropol	2	12	8	8	0.8939 +/- 0.0777	0.005825 +/- 0.003838
Rinlo	3	8	5	5	0.7857 +/- 0.1508	0.003497 +/- 0.002706
Finisterre	4	11	8	10	0.8909 +/- 0.0918	0.006463 +/- 0.004209
Carnota	5	4	3	2	0.8333 +/- 0.2224	0.003017 +/- 0.002824
Aguíño	6	14	10	9	0.9451 +/- 0.0451	0.005354 +/- 0.003536
Canarias						
Médano	7	8	5	5	0.8929 +/- 0.0858	0.004936 +/- 0.003525
Tufia	8	9	6	5	0.8333 +/- 0.1265	0.003374 +/- 0.002590

El análisis ANOVA es el más utilizado para detectar diferenciación genética (Bird *et al.*, 2011), en la tabla 4-61 se muestran los resultados de las varianzas y frecuencias haplotípicas de las poblaciones organizadas en dos grupos: Península y Canarias. El 68% de la variabilidad genética es intrapoblacional y el valor del índice de fijación $F_{ST} = 0,01168$ es no significativo ($p = 0,27$), es decir, no encontramos una estructura genética poblacional en el área estudiada. Al analizar las combinaciones de los grupos de poblaciones restantes (Tabla 4-59) tampoco se obtuvieron valores significativos de F_{ST} .

En la tabla 4-62 podemos ver debajo de la diagonal los valores de diferenciación genética Φ_{ST} entre pares de poblaciones, por encima de la diagonal aparece el p -valor. Los valores de $p > 0.05$ indican que no hay diferencias genéticas significativas entre las poblaciones consideradas en el análisis.

En la tabla 4-63 se muestra la matriz de distancia genética entre pares de poblaciones. Los valores de las distancias genéticas corregidas entre las poblaciones oscilan desde un valor de -0.13642 entre las poblaciones de Rinconcín (1) y Rinlo (3), hasta 0.19665

entre Aguiño (6) y Médano (7). Los bajos valores obtenidos apuntan en la misma dirección que los resultados del análisis anterior. No se ha detectado una diferenciación genética significativa entre las poblaciones estudiadas.

Tabla 4-61.- Resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA). 10.000 permutaciones.

Fuente de variación	d. f.	Suma de cuadrados	Varianza	Varianza total %	Índices de fijación
Entre grupos (Va)	1	0.376	-0.03351	-3.28	F _{CT} : -0.03284
Entre poblaciones dentro de grupos (Vb)	6	7.618	0.02561	2.51	F _{SC} : 0.02431
Intrapoblacional (Vc)	68	69.908	1.02805	100.77	F _{ST} : -0.00774
Total	75	77.901	1.02015		

F_{ST}: 0.01168.

p-valor: 0.26792+/-0.00460.

Tabla 4-62.- Matriz de la diferenciación genética Φ_{ST} entre pares de poblaciones de *P. lividus* (debajo de la diagonal) y su *p*-valor correspondiente (encima de la diagonal). Ninguno de los valores de Φ_{ST} fue significativo (*p*-valor < 0.05).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.59351	0.98683	0.15761	0.17830	0.41105	0.63736	0.61489
2	-0.02084		0.35729	0.07366	0.65083	0.40659	0.27354	0.44421
3	-0.05847	0.00548		0.08821	0.08148	0.29581	0.62598	0.26601
4	0.05055	0.10514	0.06702		0.76982	0.39630	0.07435	0.88407
5	0.03061	-0.03226	0.05005	-0.02120		0.18869	0.11692	0.89823
6	-0.00052	0.00531	0.01504	0.00326	0.02767		0.09761	0.86595
7	-0.02598	0.05257	-0.02532	0.09547	0.06253	0.07813		0.08336
8	-0.02479	0.01769	0.01822	-0.04815	-0.04509	-0.05403	0.08941	

Tabla 4-63. Matriz de valores de distancia genética entre las poblaciones de *P. lividus*. Los valores por encima de la diagonal muestran la media de las distancias existentes entre pares de poblaciones (PiXY). Debajo de la diagonal aparecen los valores del promedio corregido de distancias entre pares de poblaciones (PiXY-(PiX+PiY)/2).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		1.75867	2.27843	1.92852	2.27754	2.27258	2.05310	1.75386
2	0.04925		2.07304	1.50337	1.75236	1.91173	1.77987	1.34235
3	-0.13642	0.13364		2.21089	2.56965	2.54188	2.28463	2.06469
4	0.12354	0.17384	0.17593		1.80046	1.92219	1.90422	1.33798
5	0.06889	0.01917	0.13102	-0.02830		2.36543	2.27162	1.73235
6	-0.00230	0.11231	0.03703	0.02720	0.06677		2.38898	1.78701
7	-0.04922	0.15301	-0.04767	0.18179	0.14552	0.19665		1.86013
8	-0.02872	0.03523	0.05213	-0.06471	-0.07400	-0.08558	0.16010	

Un resultado similar se obtuvo en el trabajo de Durán *et al.*, 2004 al comparar la estructura genética de distintas poblaciones de *P. lividus*: 6 poblaciones del mar Mediterráneo, 5 poblaciones del océano Atlántico y una población de Tenerife. En ese estudio se observó una elevada diversidad haplotípica y valores bajos de diversidad nucleotídica en todas las poblaciones. Al comparar pares de poblaciones sólo la distancia genética entre las poblaciones de Tenerife y Cabo de Gata fue significativa, y en el análisis de la varianza molecular (AMOVA) agrupando las poblaciones atlánticas y mediterráneas se obtuvo un valor no significativo. De todo ello se dedujo que no existe una estructura genética diferenciada entre las poblaciones de *P. lividus* de las dos cuencas oceánicas; en este trabajo tampoco se encontró una diferenciación genética significativa entre las poblaciones atlánticas estudiadas.

Nuestros resultados corroboran los obtenidos por Durán *et al.*, 2004, al no detectar una diferenciación genética significativa entre las poblaciones analizadas en Galicia, Asturias y Canarias, y amplían el número de poblaciones atlánticas y canarias analizadas.

En la bibliografía consultada se encontraron numerosos estudios poblacionales de equinodermos y otras especies de invertebrados en diferentes regiones geográficas, en la tabla 4-64 se recogen algunos de ellos y los resultados correspondientes que se obtuvieron en cuanto a la existencia de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas.

Tabla 4-64.- Resultados obtenidos en otros estudios poblacionales con invertebrados en distintas zonas geográficas.

TRABAJOS PUBLICADOS	Organismo	Zona geográfica	Método de análisis	Estructura poblacional
Debenham, 2000	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	Pacífico noreste	Gen de bindina	No
Iuri <i>et al.</i> , 2007	<i>Paracentrotus lividus</i>	Sur del mar Tirreno	COI, 16S y ADNr nuclear	No
Quinteiro <i>et al.</i> , 2007	<i>Pollicipes pollicipes</i>	Atlántico noreste	mtDNA	Sí
Palumbi & Wilson, 1990	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Atlántico y Pacífico	mtDNA	No
Panaciulli <i>et al.</i> , 1997	<i>Chthamalus</i> spp.	Atlanto-Mediterránea	Alozimas	Sí
Lessios <i>et al.</i> , 1999	<i>Eucidaris</i> spp.	Atlántico y Pacífico	Gen COI	No
Lessios <i>et al.</i> , 2001b	<i>Diadema</i> spp.	Atlántico, Pacífico e Índico	mtDNA alozimas	No
Zulliger <i>et al.</i> , 2009	<i>Astropecten aranciacus</i>	Atlanto-Mediterránea	mtDNA (12S, 16S) microsatélites	Sí
Uthicke & Benzie, 2003	<i>Holothuria nobilis</i>	Indo-Pacífico	Gen COI	No
Palero <i>et al.</i> , 2008	<i>Palinurus elephas</i>	Atlanto-Mediterránea	Gen COI	Sí
Mao <i>et al.</i> , 2011	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Pacífico noroeste	Gen COI	Sí

4.6.2.3. Diversidad haplotípica.

El alineamiento resultante de integrar las secuencias obtenidas en este trabajo con las secuencias de *P. lividus* depositadas en GenBank por Durán *et al.*, 2004 se colapsó en 54 haplotipos con 43 sitios polimórficos, de los cuales 13 haplotipos nuevos fueron aportados por nuestras secuencias.

En la figura 4-43 se representa el análisis de parsimonia de los haplotipos resultantes del alineamiento conjunto de las secuencias obtenidas en este trabajo con las secuencias resultantes del trabajo de Durán *et al.*, 2004. Encontramos una elevada diversidad de haplotipos, los más frecuentes se sitúan en una posición central de la red, mientras los

menos frecuentes en general son característicos de una determinada región geográfica, derivados de una mutación relativamente reciente, y se ramifican en torno a un haplotipo de mayor frecuencia. Como podemos ver en la figura 4-43 los haplotipos más abundantes están presentes en todas las zonas geográficas estudiadas (Galicia, Asturias y Canarias), esta circunstancia revela un alto grado de homogeneidad genética entre las poblaciones (Palero *et al.*, 2008). En la parte inferior de la figura aparece una agrupación de haplotipos únicos derivados de otro más abundante que son exclusivos de poblaciones mediterráneas.

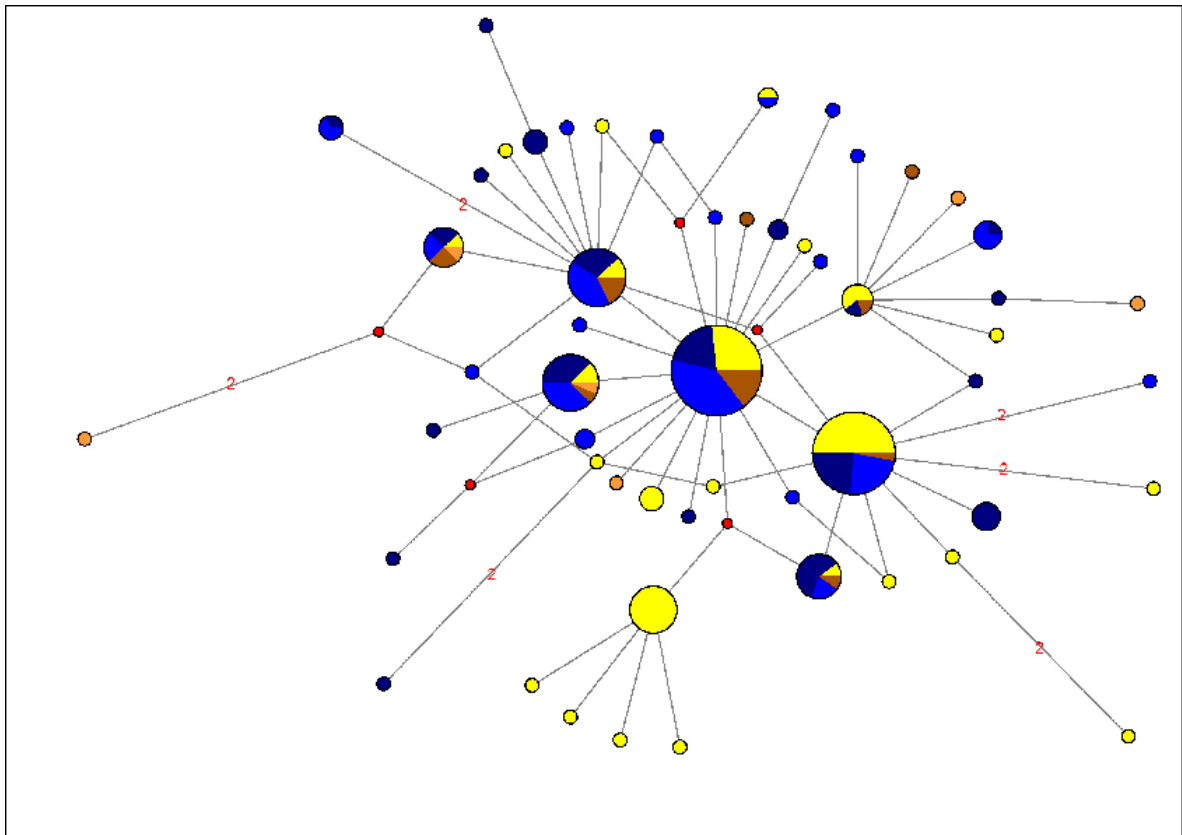


Figura 4-43.- Red de haplotipos basada en el análisis de la parsimonia de las secuencias del gen mitocondrial COI de las muestras de *P. lividus*. Los números rojos corresponden al numero de mutaciones que separan a los distintos haplotipos cuando son más de una. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que comparten ese haplotipo.

● Mediterráneo ● Atlántico (Durán *et al.*, 2004) ● Atlántico ● Canarias ● Canarias (Durán *et al.*, 2004).

La mayor parte de los haplotipos se encuentran en todas las regiones geográficas, aunque también podemos encontrar haplotipos menos frecuentes específicos de cada zona. No podemos rechazar que estos haplotipos estén presentes también en bajas

frecuencias en otras regiones y no hayan sido detectados por la baja intensidad de muestreo. Nuestros resultados son similares a los encontrados en los trabajos de Durán *et al.*, 2004 y de Calderón *et al.*, 2008, en los que la representación de la red de haplotipos muestra una distribución relativamente homogénea de los mismos en las zonas del Atlántico y del Mediterráneo estudiadas.

La baja estructura genética detectada podría deberse a que *Paracentrotus lividus* posee una elevada capacidad de dispersión por medio de sus larvas planctotróficas, que se mantienen suspendidas en la columna de agua de 20 a 40 días antes de fijarse al sustrato (Pedrotti, 1993). Esta característica contribuye a mantener un elevado nivel de flujo génico y por lo tanto una relativa uniformidad genética entre zonas geográficas distantes entre sí, aunque existen otros factores bióticos y abióticos que pueden influir en la capacidad de dispersión de las larvas (Hereu *et al.*, 2004). Las corrientes marinas suelen actuar como un canal de dispersión de las larvas planctónicas de determinados organismos, pero en ocasiones constituyen también una barrera invisible al flujo génico (Palumbi, 1994). La corriente de las Azores se divide en tres ramas al aproximarse a la costa occidental de los continentes europeo y africano. Una de estas ramas forma la corriente ibérica que asciende hacia el Polo Norte y baña la costa oeste de la península ibérica y el Golfo de Vizcaya; otra rama constituye la corriente de las Canarias que desciende paralela a la costa marroquí y una tercera rama cruza el estrecho de Gibraltar hacia el mar Mediterráneo (Quinteiro *et al.*, 2010). Esta ramificación de la corriente podría limitar la dispersión larvaria de *P. lividus*, y por tanto el flujo génico entre las tres regiones geográficas estudiadas. Otras posibles barreras al flujo génico de las especies marinas son los distintos gradientes de salinidad del agua, corrientes circulares o afloramientos de aguas profundas como ocurre en el interior de las rías gallegas; estas barreras podrían dar lugar a la existencia de una estructura poblacional en especies con una elevada capacidad de dispersión (Ward, 1989). Además de la capacidad de dispersión larvaria de una especie es necesario valorar otros aspectos como el aislamiento genético producido por grandes distancias, la selección natural, determinados acontecimientos históricos, etc. (Palumbi, 1994), aunque para que exista un aislamiento genético por distancia entre las distintas zonas geográficas estudiadas, ésta debe superar de 2 a 5 veces la distancia que pueden alcanzar las larvas al dispersarse en la columna de agua.

El hecho de que el análisis de las poblaciones de *P. lividus* con RAPDs apunte hacia la existencia de diferenciación genética entre Canarias y el NW peninsular y la secuenciación del gen COI mitocondrial no haya encontrado diferenciación genética entre las mismas poblaciones resulta sorprendente y puede deberse a diversos factores. Los marcadores RAPDs son menos específicos, van dirigidos a dianas que abarcan todo el genoma, especialmente el genoma nuclear. Una posibilidad es que la diferenciación genética detectada con los marcadores nucleares entre las poblaciones de la península y de Canarias refleje una divergencia genética reciente, quizá relacionada con la adaptación local de las poblaciones en respuesta a diferencias ambientales como la temperatura, el fotoperiodo, etc. Estos son aspectos que la secuenciación de un gen mitocondrial no puede detectar. Otra posibilidad es que las diferencias en los patrones de RAPDs no reflejen diferencias genéticas, sino consecuencia de la existencia de diferencias en el estado de preservación de las muestras procedentes de las distintas poblaciones, ya que una muestra con el ADN fragmentado puede conducir a la generación de artefactos. Sin embargo, el hecho de que cada una de las ramas de los dendrogramas incluya muestras de diferentes poblaciones tanto en Canarias como en la península Ibérica, que hayan podido ser manipuladas de manera ligeramente diferente, apunta hacia la robustez de nuestros análisis.

Para aclarar este punto se podrían plantear diversos trabajos a realizar empleando otros marcadores moleculares como los microsatélites, que nos aportarían nuevos datos y por tanto ayudarían a establecer la estructura genética de las poblaciones de *P. lividus* en las zonas geográficas estudiadas.

A la vista de los resultados obtenidos, que no permiten descartar la existencia de diferencias genéticas entre las poblaciones canarias y peninsulares, para futuras repoblaciones con juveniles de *Paracentrotus lividus* se aconseja seleccionar a los individuos reproductores en una zona del litoral marítimo perteneciente al mismo hábitat que se pretende repoblar. Otro aspecto a tener en cuenta es el interés en preservar una elevada diversidad genética, similar a la observada en las poblaciones naturales, en las poblaciones restauradas. Las poblaciones de *P. lividus* que sufrieron una sobreexplotación se vieron afectadas también por una pérdida de variabilidad genética, este proceso se conoce como erosión genética y afecta tanto a especies animales como vegetales y microorganismos. Un proceso de erosión genética

continuada conllevaría una gran pérdida de variabilidad genética y por tanto la pérdida de la capacidad de adaptación de una especie ante los cambios ambientales (cambios de temperatura, salinidad, epidemias, etc.), este fenómeno podría desembocar en la extirpación local de la especie. Otro problema relacionado con la pérdida de diversidad genética es la depresión por endogamia derivada de la homocigosis de alelos recesivos deletéreos, que desembocarían en enfermedades y problemas en cuanto a calidad genética y evolución de la especie en general. Por ello se aconseja mantener un elevado número de parentales diferentes en los criaderos y el monitoreo de la diversidad genética con marcadores moleculares.

4.6.4. Conclusiones.

1. Con los datos obtenidos en este estudio no podemos determinar la existencia de una estructura poblacional en el área geográfica analizada, sería necesario ampliar el estudio con otros marcadores genéticos.
2. La distribución de los haplotipos más abundantes por todas las zonas geográficas estudiadas sugiere una elevada homogeneidad genética entre las poblaciones.
3. La repoblación de hábitats sobreexplotados debe realizarse con individuos procedentes de la misma zona, ya que no podemos descartar la existencia de una estructura genética poblacional.

5. DISCUSIÓN GENERAL

La creciente importancia económica del erizo de mar en Galicia hace necesario que se planteen estrategias de cultivo de este equinodermo, tanto para su explotación industrial como para repoblación, con vistas a mantener las poblaciones naturales de *Paracentrotus lividus* en niveles sostenibles. En este trabajo se ha estudiado la posible viabilidad del cultivo de erizo en batea, sistema tradicional utilizado en Galicia para el cultivo de mejillón, lo que permitiría una nueva utilización de las mismas, así como la diversificación de los cultivos marinos. Para ello, se han diseñado y probado estructuras de confinamiento de los ejemplares, condiciones de cultivo, nuevas dietas tanto para crecimiento somático como para crecimiento gonadal, así como la caracterización genética de poblaciones de erizos peninsulares y canarios.

Se han diseñado numerosas estructuras de cultivo para erizos de mar en diversos trabajos, tanto para sistemas de cultivo terrestres basados en circuito cerrado de agua (Hagen, 1996; Basuyaux *et al.*, 1998), como destinadas al engorde de erizos juveniles en sistemas de cultivo en el mar (Fernandez & Caltagirone, 1994; Fernandez, 1996; James, 2006b). En los últimos años existe una clara tendencia al desarrollo de estructuras de cultivo de esta especie en el medio marino, diseñándose jaulas sumergidas (Robinson & Colborne, 1998), así como sistemas de policultivo con especies como el salmón (Kelly *et al.*, 1998), o sistemas multitróficos (González, *et al.*, 2012).

En nuestro caso, las estructuras de cultivo diseñadas para el engorde de erizos en batea son eficaces, manejables y se adaptan bien a las necesidades de un cultivo a pequeña escala, sin embargo, si se quiere desarrollar una explotación industrial de mayor envergadura, sería necesario comprobar, mediante experiencias a escala piloto, la posible capacidad de carga de erizos en la batea en función de su superficie, altura manejable de estructuras, así como sistemas de apertura de las mismas rápida y segura para la alimentación de los individuos. Ello permitiría la realización de un estudio económico fiable para analizar la viabilidad de cualquier planteamiento de cultivo industrial, bien sea para cultivo completo hasta tamaño comercial, bien para cultivo hasta tamaño adecuado para repoblación, o bien para el engorde de gónadas en periodos cortos de tiempo. Por supuesto, también se podrían mezclar en una misma batea todos los sistemas, sea cual sea el objetivo final del cultivo.

El posible diseño de estructuras de confinamiento para uso en explotaciones industriales, tendría que tener en cuenta el tamaño inicial de los erizos. En el caso de erizos pequeños procedentes de criadero (sobre 5 mm de diámetro), se podrían utilizar cajas apilables de 50 x 50 cm y con altura de 10 cm, que tengan ranuras de ventilación de 2 mm, lo que permitiría la sujeción a la batea por un único cabo que pasaría por el centro de las cajas. Esta fase es la que requiere más trabajo, ya que deberán ser cambiadas las cajas cada 15 días, para proceder a su limpieza y evitar que el fouling acumulado obstruya o dificulte el paso de agua a través de las rendijas. También es necesario la clasificación y desdoble de los erizos, a medida que vayan creciendo, para introducirlos en cajas similares pero con rendijas más grandes (prolongando el tiempo entre limpiezas) y disponerlos en menor densidad. En el caso de cultivo con fines de repoblación, este proceso se prolongaría cerca de un año y las ranuras finales serían de 8 mm, con densidades iniciales de 20.000 erizos/m² (5.000 erizos/caja) y finales de 1.400 erizos/m² (350 erizos/caja). Las columnas podrían tener un total de 18 cajas, lo que nos daría una altura de columna de 1,80 m, que sería manejable con sistemas de izado portátiles (ver figura 3-3), sin depender de grúa instalada en una embarcación, tal como es habitual en el laboreo del mejillón. El total de erizos por columna sería de 90.000 al inicio y de 6.300 al final.

En el cultivo de erizos procedentes de criadero y hasta tamaño comercial, al proceso anterior habría que añadir el realizar desdobles e ir cambiando el tamaño de ranuras en las cajas (ahora con altura de 20 cm) hasta los 2 cm, con densidades finales de 160 erizos/m² (40 erizos/caja), durante 3 años más (un total de 4 años de cultivo desde su nacimiento). Las columnas serían del mismo tamaño que en el ejemplo anterior, aunque con la mitad de cajas (9 en total). El total final de erizos por columna sería de 360 erizos y un peso aproximado de 30 kg.

En el proceso de engorde de gónadas, se utilizarían erizos de tamaño comercial (más de 55 mm de diámetro), que se alimentarían durante uno o dos meses con dietas diseñadas y preparadas en laboratorio. Las columnas, número de cajas y erizos, así como el peso de los mismos, sería similar al total final del apartado anterior. Las columnas de cajas deberían disponer de una abertura lateral con puerta, con el fin de permitir su alimentación sin tener que desmontar la estructura, lo que facilitaría esta labor con el

consiguiente ahorro de tiempo. Uno de los modelos diseñados en este sentido se puede ver en la figura 5-1.



Figura 5-1.- Modelo de columna de cajas diseñado con apertura lateral para facilitar las labores de alimentación de los erizos.

Otro dato de interés para la actividad industrial sería la cantidad de columnas que se podrían instalar en una batea, lo que nos proporcionaría una idea de la producción. Aunque este dato depende de la autorización que conceda la Xunta de Galicia, en el momento de autorizar una batea para el cultivo de erizo, estimamos que, siguiendo las pautas aprobadas para el cultivo de mejillón, se podrían instalar un total de 500 columnas de cajas dispuestas la mitad de ellas a una profundidad de 4 a 5,8 m, y la otra

mitad entre 6 y 7,8 m, para evitar en lo posible el choque entre las cajas de diferentes columnas en caso de temporales.

Con esta disposición de columnas, tendríamos una capacidad final de cultivo, en erizos de tamaño comercial, de 180.000 erizos, con un peso de 15.000 kg. En el caso de erizos para repoblación (2 cm de diámetro), la capacidad de la batea sería de 3.150.000 erizos dispuestos para su salida al medio natural, con la posibilidad de convertirse en una producción teórica de 262.500 kg (después de unos 4 años en el medio natural, aunque sin contar con la mortalidad que se pueda producir en estas condiciones). Esta posible producción obtenida mediante la repoblación, significa aproximadamente un 37,5% de la producción media anual extraída en Galicia (sobre 700.000 kg anuales).

En la tabla 5-1 se muestran las principales características de estructuras, tiempos y producción de una batea dedicada al cultivo de erizos, dependiendo del uso final del producto obtenido.

Tabla 5-1.- Estructuras, tiempo de cultivo y producción de la batea.

Tiempo (meses)	Tamaño (mm Ø)	Medidas caja (cm)	Ranura (mm)	Nº cajas/columna	Erizos /caja	Erizos/columna	Uso final erizos
0-6	0-5	CRIADERO					
6	5	50x50x10	2	18	5.000	90.000	
12	20	50x50x10	8	18	350	6.300	Repoblación
36	20-55	50x50x20	20	9	350	6.300	Comercialización
1-2	>55	50x50x20	20	9	350	6300	Comercialización

○ Erizos de criadero ● Erizos destinados a repoblación o comercialización ● Engorde de gónadas

Existen numerosos trabajos que acreditan la influencia de la alimentación suministrada a los erizos sobre sus posteriores características fisiológicas (Lawrence *et al.*, 1989, 1992; Fernández & Pergent, 1998; Daggett *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Cook & Kelly, 2007), así como la importancia del aporte proteico de la dieta, indispensable para un crecimiento óptimo de los individuos (Fernandez, 1998; Fernandez & Pergent, 1998;

Fernandez & Boudouresque, 2000; Senaratna *et al.*, 2005; Schlosser *et al.*, 2005). Las dietas diseñadas en nuestro laboratorio para el engorde de los erizos demostraron tener un buen comportamiento en cuanto a su durabilidad en el agua de mar y la posibilidad de conservarlas en frío, siendo además bien aceptadas por los mismos.

Los datos de crecimiento de los erizos son buenos en general, ya que alcanzan la talla comercial (55 mm de diámetro) en menos de cuatro años, cuando los erizos del medio natural en las costas de Irlanda tardan cuatro años en alcanzar una talla de 35-50 mm de diámetro y posteriormente ralentizan su crecimiento (Crapp & Willis, 1975); un trabajo realizado por Catoira en 1999 en las costas de Galicia estimó que harían falta 8 o 9 años desde el nacimiento de los erizos para que alcanzaran este tamaño. Los mejores datos de crecimiento se obtuvieron con dietas naturales basadas en algas (*Ulva* spp. y *Laminaria* spp.). Un cultivo de erizos que abarque su engorde desde la etapa de juveniles hasta que alcanzan un tamaño comercial no sería rentable en este momento debido a la inversión que sería necesaria en materiales y al bajo precio de venta del kilogramo de erizo en el mercado (3 € aproximadamente), sin embargo, sería muy interesante la posibilidad de realizar un cultivo parcial de los erizos juveniles, procedentes de criadero o del medio natural, alimentándolos con algas durante un periodo de tiempo determinado con el fin de que alcancen un tamaño adecuado que les permita protegerse de los depredadores y sobrevivir en su hábitat natural. En caso de que escasee temporalmente el suministro de algas, el cultivo podría mantenerse alimentando a los erizos con los piensos diseñados, ya que tienen una buena aceptación por su parte y los datos de crecimiento que se obtienen con ellos son elevados, aunque en menor medida que con una alimentación basada en algas. Este cultivo permitiría acelerar así las tareas de repoblación de *Paracentrotus lividus* en su entorno natural.

Los piensos diseñados en el laboratorio para incrementar el índice gonadal de los erizos de tamaño comercial resultaron ser muy eficaces, destacando las dietas 4 y 4C; estas dietas se caracterizan por su alto contenido en proteínas, las cuales favorecen una acumulación de sustancias de reserva en las gónadas que repercutirá a su vez en un aumento del tamaño de las mismas (Fernández, 1997; McBride *et al.*, 1997; Liyana-Pathirana *et al.*, 2002). El IG más elevado que obtuvimos en esta experiencia alcanzó un valor del 15.56% del peso fresco del erizo, siendo superior al obtenido en otros trabajos como el realizado por Cook & Kelly en el año 2007, en el que se obtuvo un valor del IG

del 10,4%. Los erizos salvajes de Galicia presentan normalmente un valor del IG del 12,2%. (Montero-Torreiro y García-Martínez, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo son muy alentadores ya que conseguimos un incremento considerable del índice gonadal de los erizos de cultivo con respecto a los del medio natural, además logramos que el IG mantuviera valores elevados durante al menos los dos meses posteriores al desove natural de los erizos. Estos resultados nos permitirían ampliar el periodo de explotación de *P. lividus* mediante una alimentación con estas dietas durante un periodo previo al desove natural de los erizos, este engorde previo duraría como máximo dos meses para que la inversión realizada fuese rentable. Además, el incremento en el IG de los erizos cultivados respecto al medio natural, repercutiría en un aumento del precio de venta de la gónada en el mercado. Las cualidades organolépticas de las gónadas procedentes de los erizos cultivados en la batea son fundamentales para su posterior precio de venta en el mercado, una de las cualidades más importantes es el color, si las gónadas son de color amarillento, naranja pálido o marrón oscuro su precio en el mercado se devaluará debido a que su aspecto no es apetecible para el consumidor (Robinson *et al.*, 2002).

El color que presentan la mayor parte de las gónadas extraídas de los erizos es de un naranja brillante debido a la inclusión de pigmentos naturales en las dietas, procedentes de la microalga *Dunaliella salina*, y su sabor no se diferencia del sabor de las gónadas extraídas de los erizos del medio natural.

Los estudios de caracterización genética de las poblaciones de *P. lividus* de la península y de Canarias revelan resultados diferentes con los marcadores moleculares utilizados; el estudio genético poblacional realizado con RAPDs detecta una estructura poblacional definida, es decir, una diferenciación genética significativa entre las poblaciones del noroeste de la península ibérica y las poblaciones de Canarias; sin embargo, los análisis de las secuencias obtenidas mediante la amplificación del gen mitocondrial COI del ADN mitocondrial (Cantatore *et al.*, 1998) no detectaron esta estructura poblacional. El hecho de que el análisis genético de estas poblaciones mediante la amplificación del gen COI no encontrara resultados análogos, no significa que no exista diferenciación; es posible que el uso de este marcador molecular no haya detectado la existencia de variabilidad genética derivada de los procesos de adaptación a las condiciones

ambientales características de cada zona geográfica. Sería interesante plantear un futuro trabajo complementario, utilizando microsatélites como marcadores moleculares, o plantear un estudio de genómica poblacional empleando técnicas tipo RAD-sequencing (Baird *et al.*, 2008, Hohenlohe *et al.*, 2010). Estas técnicas permiten caracterizar decenas de miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) simultáneamente y han demostrado ser útiles para identificar loci o regiones genómicas implicadas en adaptación local en varios trabajos publicados hasta la fecha.

Existen gran cantidad de estudios filogeográficos realizados con poblaciones de erizos y otros invertebrados en diversas áreas geográficas, algunos de ellos se presentan en la tabla 4-64 del apartado 4.6.3.1., cuyos resultados son también muy dispares en cuanto a la detección o no de una estructura poblacional definida. Los trabajos de Debenham, 2000 (*Strongylocentrotus franciscanus* en el Pacífico noreste) y de Iuri *et al.*, 2007 (*Paracentrotus lividus* en el sur del mar Tirreno) con distintos marcadores, no detectaron la existencia de una estructura genética poblacional, sin embargo, el trabajo realizado por Quinteiro *et al.*, 2007 (*Pollicipes pollicipes* en el Atlántico noreste) utilizando ADN mitocondrial como marcador, sí detectó la existencia de esta estructura. La mayor parte de los estudios realizados con *Paracentrotus lividus* (Durán *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2008; Maltagliati *et al.*, 2010) comparando poblaciones del océano Atlántico y del mar Mediterráneo, no encontraron diferenciación genética significativa entre las poblaciones atlánticas estudiadas. Como mencionamos anteriormente, esta circunstancia podría explicarse por la elevada capacidad de dispersión de las larvas planctotróficas de *P. lividus*, que propiciaría la existencia de un elevado flujo génico entre áreas geográficas distantes entre sí, favoreciendo una homogenización genética de las poblaciones. Sin embargo, es necesario tener en cuenta otros factores tanto bióticos como abióticos que pueden influir en el aislamiento genético de las mismas (Quesada *et al.*, 1995).

Las corrientes predominantes en un área determinada pueden ejercer como corredores de flujo génico, favoreciendo la dispersión de las larvas en la columna de agua, pero también como barreras invisibles al intercambio de este flujo génico entre las poblaciones; la disponibilidad de fitoplancton, los afloramientos, remolinos y otros fenómenos hidrodinámicos a pequeña escala pueden influir en las tasas de reclutamiento y en el asentamiento de las larvas. La ausencia de hábitat adecuado en grandes

distancias geográficas u otras barreras biogeográficas contemporáneas o históricas pueden limitar la conectividad genética de las poblaciones. Por último, la selección en contra de genotipos no adaptados localmente es otro mecanismo que puede determinar el aislamiento genético de poblaciones de una especie (Palumbi, 1994; Williams, 1975).

Los datos relacionados con los índices de diversidad obtenidos en este trabajo concuerdan con los resultados de los trabajos de Durán *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2008 y Maltagliati *et al.*, 2010; en todos los casos se obtienen índices de diversidad nucleotídica muy bajos e índices de diversidad haplotípica elevados, con una alta proporción de haplotipos de baja frecuencia.

El análisis de parsimonia de los haplotipos cuando combinamos nuestras secuencias con las secuencias obtenidas en el trabajo de Durán *et al.*, 2004 muestra una red con una distribución relativamente homogénea de los mismos. Los haplotipos más frecuentes se encuentran en poblaciones de las tres zonas geográficas estudiadas, aunque existe también una alta proporción de haplotipos característicos de un área determinada. Esta circunstancia podría deberse a la explosión demográfica de *P. lividus* en el Pleistoceno tardío, las mutaciones ocurridas durante el proceso de expansión de la población hacia nuevos territorios, y que suponen una mejor adaptación al medio de los individuos que las poseen, se fijan en el genoma originando haplotipos característicos de la nueva región colonizada.

Los resultados obtenidos en este trabajo no nos permiten determinar la existencia de una estructura genética poblacional pero tampoco descartarla, por lo que sería aconsejable que la repoblación de hábitats que hayan sido sobreexplotados se realizase con individuos juveniles de *P. lividus* procedentes de la misma región. Además se recomienda que los individuos reproductores mantengan una diversidad genética lo más elevada posible con el fin de conservar la biodiversidad de la zona y evitar así futuros problemas de erosión genética y depresión por endogamia.

6. CONCLUSIONES GENERALES

1. Las estructuras diseñadas para el engorde de erizos en batea son eficaces y manejables, adaptándose bien a las necesidades de un cultivo a pequeña escala.
2. La tasa de crecimiento de los erizos procedentes de criadero es mayor que la de erizos del medio natural, siendo las dietas que mejor funcionan las basadas en algas.
3. Las dietas diseñadas para el engorde son bien aceptadas por los erizos, mantienen sus propiedades en el agua de mar al menos una semana y permiten su conservación mediante congelación, pudiendo ser eficaces para mantener el cultivo de erizos en caso de escasez en el suministro de algas.
4. Un engorde parcial en batea de erizos juveniles permitiría acelerar las tareas de repoblación de *P. lividus* en su entorno natural.
5. Las dietas 4 y 4C, diseñadas en el laboratorio para incrementar el índice gonadal de los erizos de tamaño comercial mediante su utilización durante uno o dos meses, permitirían ampliar el periodo comercial de los erizos y aumentar el IG respecto al medio natural.
6. El estudio de la genética poblacional con marcadores mitocondriales refleja una distribución generalizada de los haplotipos más abundantes por todas las zonas geográficas estudiadas, lo que sugiere una elevada homogeneidad genética entre las poblaciones.
7. El resultado de los análisis con marcadores moleculares no puede determinar la existencia o no de una estructura genética poblacional, sin embargo, el análisis de secuencias nucleares apunta hacia la posible existencia de una estructura poblacional fina entre los erizos de Canarias y las otras dos CC.AA. participantes en el proyecto, por lo que se recomienda la realización de estudios complementarios, así como el uso de juveniles procedentes de reproductores canarios, para realizar la repoblación en las islas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Addison, J.A. & Hart, M.W. (2004). Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. *Marine Biology*, 144: 243-251.
- Agassiz, L. & Desor, E. (1846). Catalogue raisonné des familles, des genres et des espèces de la classe des Échinodermes, précédé d'une introduction sur l'organisation, la classification et le développement progressif des types dans la série des terrains par M. L. Agassiz. *Annales des Sciences Naturelles et Zoologie de Paris*, 6: 305–374.
- Alabi, A.O., Saunders, R., Fast, C., Yuan, S., Chen, Y., Chapman, L. (2001) Status of sea urchin research at Island Scallops Ltd. In: Hiemstra L. (ed.) Proceedings of the Sea Urchin Culture Workshop. 24–25 September 2001. Dorchester Hotel, Nanaimo, BC. Malaspina University College Publication, Nanaimo.
- Aldrich, J. & Cullis, C. A. (1993). RAPD Analysis in Flax: Optimization of Yield and Reproducibility using *KlenTaq* 1 DNA Polymerase, Chelex 100, and Gel Purification of Genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11 (2): 128-141.
- Allain, J. Y. (1972). Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck), (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes du Nord de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 39 (2): 171-212.
- Allain, J. Y. (1978). Age et croissance de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et de *Psammechinus miliaris* (Gmelin) des cotes Nord de Bretagne (Echinoidea). *Cah. Biol. Mar*, 19: 11-21.
- Andrew, N.L., Agatsuma, Y., Ballesteros, E., Bazhin, A.G., Creaser, E.P., Barnes, D.K.A., Botsford, L.W., Bradbury, A., Campbell, A., Dixon, J.D., Einarsson, S., Gerring, P.K., Hebert, K., Hunter, M., Hur, S.B., Johnson, C.R., Juinio-Menez, M.A., Kalvass, P., Miller, R.J., Moreno, C.A., Palleiro, J.S., Rivas, D., Robinson, S.M.L., Schroeter, S.C., Steneck, R.S., Vadas, R.L., Woodby, D.A. and Xiaoqi, Z. (2002). Status and management of world sea urchin fisheries. *Ocean. Mar. Biol.*, 40: 343–425.
- Arce, E.; Luna-Figueroa, J. (2003). Efecto de dietas con diferente contenido proteico en las tasas de crecimiento de crías del Bagre del Balsas *Ictalurus balsanus* (Pisces: Ictaluridae) en condiciones de cautiverio. *Revista AquaTIC*, 18: 39-47.

- Arndt, A., Marquez, C.; Lambert, P. & Smith, M. J. (1996). Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 6: 425–437.
- Azzolina, J.F. & Willsie, A. (1987). Abundance des juveniles de *Paracentrotus lividus* au sein de l'herbier a posidonia oceanica. In : Boudouresque, GIS Posidonie, IFREMER (Eds.). *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*. Marseille: 159-167.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A. *et al.* (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3 (10): e3376.
- Baker, A.N., Rowe, F.W.E. & Clark, H.E.S. (1986). A new class of Echinodermata from New Zealand. *Nature*, 321: 862 – 864.
- Ballesteros, E. & García Rubies, A. (1987). *La peche aux oursins en espagne et plus particulièrement en Catalogne*. In: C. F. BOUDOURESQUE (Ed.). Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseille: 325-328.
- Bamford, D.R. (1982). Epithelial absorption. In: Jangoux, M., Lawrence, J.M. (Eds.) *Echinoderm nutrition*. Balkema, Rotterdam.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Rohlf, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16 (1): 37-48.
- Barbaglio, A., Sugni, M., Di Benedetto, C., Bonasoro, F., Schnell, S., Lavado, R., Porte, C., Candia Carnevalli, D.M. (2007). Gametogenesis correlated with steroid levels during the gonadal cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.*, 147: 466-474.
- Barker, M. F.; Keogh, J. A.; Lawrence, J. M. & Lawrence, A. L. (1998). Feeding rate, absorption efficiencies, growth, and enhancement of gonad production in the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* Valenciennes (Echinoidea: Echinometridae) fed prepared and natural diets. *J. Shellfish Res.*, 17: 1583-1590.
- Barnes, D.K.A. & Crook, A.C. (2001a). Implications of temporal and spatial variability in *Paracentrotus lividus* populations to the associated commercial coastal fishery. *Hydrobiologia*, 465: 95-102.
- Barnes, D.K.A. & Crook, A.C. (2001b). Quantifying behavioural determinants of the coastal european sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 138: 1205-1212.

- Basuyaux, O. & Blin, J.L. (1998). Use of maize as a food source for sea urchins in a recirculating rearing system. *Aquaculture international*, 6 (3): 233-247.
- Besteiro, C. & Urgorri, V. (1988). Inventario dos Equinodermos de Galicia (Echinodermata). *Cadernos da Area de Ciencias Biolóxicas (Inventarios)*. Seminario de Estudos Galegos, 1. O Castro-Sada, A Coruña: Ed. Do Castro, 51 p.
- Bird, C.E., Smouse, P.E., Karl, S.A. and Toonen, R.J. (2011). Detecting and measuring genetic differentiation. In: *Crustacean Issues: Phylogeography and Population Genetics in Crustacea* (In: Koenemann, S., Held, C., Schubart, C. Eds.): 31–55. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Bottjer, D.J.; Davidson, E.H.; Peterson, K.J.; Cameron, R.A. (2006). Paleogenomics of Echinoderms. *Science*, 314: 956-960.
- Boudouresque, C. & Verlaque, M. (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. in *Edible sea urchins: biology and ecology*.
- Breen, P.A., Carolsfeld, W., Yamanaka, K.L. (1985). Social behaviour of juvenile red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus* (Agassiz). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 92: 45-61.
- Brody, S. (1945). Bioenergetics and growth. Reinhold, New York.
- Bückle, F., Guisado, Ch., Serrano, C., Córdoba, L., & Vásquez, E. (1977). Estudio del crecimiento en cautiverio del erizo *Loxechinus albus* (Molina) en las costas de Valparaíso y Chiloé, Chile. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*, 4 (1): 153-160.
- Bückle, F., Guisado, Ch., Tarifeño, E., Zuleta, A., Córdoba, L., & Serrano, C. (1978). Biological studies on the Chilean sea urchin *Loxechinus albus* (Molina) (Echinodermata: Echinoidea). IV. Maturity cycle and seasonal biochemical changes in the gonad. *Ciencias Marinas México*, 5(1): 1-18.
- Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L. & Cinelli, F. (1999). Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241 (1): 81-95.
- Burke, R.D. (1983). The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae: stimulus and response. *Can. J. Zool.*, 61: 1701-1719.
- Busacker, G. P.; Adelman, I. R. & Goolish, E. M. (1990). Growth. In: *Methods for fish biology*: 363-388 (C. B. Schreck & P. B. Moyle, Eds.). American Fishery Society, Bethesda (Maryland).

- Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology (Historical Archive)*, 104 (2): 275-289.
- Calderón, I.; Giribet, G. & Turon, X. (2008). Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Marine Biology*, 154: 137–151.
- Calderón, I.; Palacín, C.; Turon, X. (2009). Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Mol. Ecol.*, 18 (14): 3036-3049.
- Calderón, I.; Turon, X. (2010). Temporal genetic variability in the Mediterranean common sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 408: 149-159.
- Cameron, R.A. & Hinegardner, R.T. (1974). Initiation of metamorphosis in laboratory cultured sea urchins. *Biological Bulletin*, 146: 335-342.
- Cameron, R.A. & Schroeter, S.C. (1980). Sea urchin recruitment: effect of substrate selection on juvenile distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2: 243-247.
- Cantatore, P.; Roberti, M.; Rainaldi, G.; Gadaleta, M. N. and Saccone, C. (1988). The Complete Nucleotide Sequence, Gene Organization, and Genetic Code of the Mitochondrial Genome of *Paracentrotus Lividus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (19): 10965-10975.
- Catoira, J.L. (1992). La peche des oursins en Galice, Espagne pendant la campagne 1990-1991. En: L. Scalera-Liaci y C. Canicatti (Eds.). *Echinoderm Research*, Balkema, Róterdam. : 199-200.
- Catoira, J.L. (1995). Spatial and temporal evolution of the gonad index of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in Galicia, Spain. *Echinoderm Research*, 1995: 295-298.
- Catoira, J.L. (1999). Outros recursos e outras economías: ourizos. Cultivando o mar: a acuicultura do milenio: 47-60.
- Catoira, J.L. (2003). Biología, gestión y explotación del erizo en Galicia. *Jornadas del Mar* organizadas por la Cofradía de pescadores “San Martiño” de Bueu. Bueu, 24 octubre, 2003.

- Catoira, J.L. (2004). History and current state of sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) fisheries in Galicia, NW Spain. In: Lawrence, J.M., Guzmán, O. (Eds.) Sea Urchins: Fisheries and Ecology. Destech publications, Lancaster: 64-73.
- Catoira Gómez, J.L., Mosquera Tallón, G. y Martínez Patiño, D. (1995). Informe Técnico de la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura: Proyecto de cultivo de erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck) en laboratorio y de seguimiento en medio natural. Planes Nacionales de Cultivos Marinos. 1994. JACUMAR.
- Cellario, C. & Fenaux, L. (1990). *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): Parameters of growth observed during two years following metamorphosis. *Aquaculture*, 84 (2): 173-188.
- Cobo, E. (2007). Bioestadística para no estadísticos. Elsevier-Masson (Eds.). 362 p.
- Cockerham, C. (1969). Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23: 72-84.
- Cockerham, C. (1973). Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74: 679-700.
- Cook, E.J., Kelly, M.S. & McKenzie, J.D. (1998). Somatic and gonadal growth of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin) fed artificial salmon feed compared with a macroalgal diet. *J. Shellfish Res.*, 17: 1549-1555.
- Cook, E.J. & Kelly, M.S. (2007). Enhanced production of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in integrated open-water cultivation with Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture*, 273 (4): 573-585.
- Cook, E.J., Hughes, A.D., Orr, H., Kelly, M.S. & Black, K.D. (2007). Influence of dietary protein on essential fatty acids in the gonadal tissue of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquaculture*, 273 (4): 586-594.
- Crapp, G.B. & Willis, M.E. (1975). Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck), with notes on the reproductive cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20 (2): 157-178.
- Christiansen, J.S.; Siikavuopio, S.I. (2007). The relationship between feed intake and gonad growth of single and stocked green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in a raceway culture. *Aquaculture*, 262: 163-167.
- Crook, A.C.; Verling, E.; Barnes, D.K.A. (1999). A comparative study of the covering reaction of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck), under laboratory and field conditions. *J.Mar. Biol. Assoc. UK*, 79: 1117-1121.

- Crook, A.C.; Long, M. & Barnes, D.K.A. (2000). Quantifying daily migration in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, 80: 177-178.
- Daggett, T.L., Pearce, C.M., Tingley, M., Robinson, S.M.C. & Chopin, T. (2005). Effect of prepared and macroalgal diets and seed stock source on somatic growth of juvenile green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 244 (1-4): 263-281.
- Dance, C. (1987). Patterns of activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Bay of Port-Cros (France, Mediterranean). *Mar. Ecol.*, 8 (2): 131-142.
- Debenham, P.; Brzezinski, M. A. & Foltz, K. R. (2000). Evaluation of sequence variation and selection in the bindin locus of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *J. Mol. Evol.*, 51: 481-490.
- De Jong-Westman, M., March, B.E., Carefoot, T.H. (1995). The effect of different nutrient formulations in artificial diets on gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Can. J. Zool.*, 73: 1495-1502.
- Dincer, T. & Cakli, S. (2007). Chemical composition and biometrical measurements of the Turkish sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816). *Critical reviews in food science nutrition*, 47: 21-26.
- Dolmatov, I., Mashanov, V. & Zueva, O. (2007). Derivation of muscles of the Aristotle's lantern from coelomic epithelia. *Cell and Tissue Research*, 327 (2): 371-384.
- Domenici, P., González-Calderón, D., Ferrari, R.S. (2003). Locomotor performance in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 83 (2): 285-292.
- Dubois, Ph., & Chen, C. (1989). *Calcification in echinoderms*. In: Jangoux, M., Lawrence, J.M. (eds). *Echinoderm studies*, 3. Balkema, Rotterdam: 109–178.
- Durán, S., Palacín, C., Becerro, M.A. & Turon, X. & Giribet, G. (2004). Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Molecular ecology*, 13: 3317-3328.
- Dworjanyan, S. A.; Pirozzi, I.; Liu, W. (2007). The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *Aquaculture*, 273: 624-633.
- Ebert, T. A. (1966). *Local variations of growth, feeding, regeneration and size structure in a natural population of the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus (Stimpson)*. Ph.D. Thesis. Univ. Oregon, Eugene, Ore. 133 p.

- Ebert, T.A. (1968). Growth rates of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* related to food availability and spine abrasion. *Ecology*, 49 (6): 1075-1091.
- Ebert, T.A., Dixon, J.D., Schroeter, S.C., Kalvass, P.E., Richmond, N.T., Bradbury, W.A., Woodby, D.A. (1999). Growth and mortality of red sea urchins *Strongylocentrotus franciscanus* across a latitudinal gradient. *Marine Ecology Progress Series*, 190: 189-209.
- Ebling, F.J., Hawkins, A.D., Kitching, J.A., Muntz, L. & Pratt, V. (1966). The ecology of Lough Ine XVI. Predation and diurnal migration in the *Paracentrotus* community. *The Journal of Animal Ecology*, 35 (3): 559-566.
- Entrambasaguas, L.; Pérez-Ruzafa, A.; García-Charton, J. A.; Stobart, B. and Bacallado, J. J. (2008). Abundance, spatial distribution and habitat relationships of echinoderms in the CaboVerdeArchipelago (eastern Atlantic). *Marine and Freshwater Research*, 59: 477-488.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online*, 1: 47-50.
- Fenaux, L. (1968). Maturation des gonads et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (Echinides) à Villefranche-Sur-Mer. Station Zoologique, 06- Villefranche-sur-Mer. *Vie Milieu*, 13: 1-52.
- Fenaux, L., Etienne, M., Quelart, G. (1987) Suivi écologique d'un peuplement de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) dans la baie de Villefranche sur Mer. In: Boudouresque, C.F. (Ed.). Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseille: 187-197.
- Fernandez, C. (1990). *Recherches preliminaries a la mise en place d'un pilote d'aquaculture de l'oursin Paracentrotus liuidus dans un Ctang corse*. Mem. D.E.A. Octanologie, Univ. Aix-Marseille.
- Fernandez, C. (1996). *Croissance et nutrition de Paracentrotus lividus dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle*. Thèse de doctorat. Université de Corse, 278 p.
- Fernandez, C. (1997). Effect of diet on the biochemical composition of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) under natural and rearing conditions (effect

of diet on biochemical composition of urchins). *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A (4): 1377-1384.

- Fernandez, C., Dombrowski, E., Caltagirone, A. (1995). Gonadic growth of adult sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in rearing: the effect of different diet type. In: Emson, R., Smith, A., Campbell, A. (Eds). *Echinoderms research*. A.A. Balkema, Rotterdam: 269–275.
- Fernández, C., Caltagirone, A. & Johnson, M. (2001). Demographic structure suggests migration of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a coastal lagoon. *J. Mar.Biol. Ass. UK.*, 81: 361-362.
- Fernandez, C. & Boudouresque, C.F. (1997). Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* in a lagoonal environment. *Marine Ecology Progress Series*, 152: 145-154.
- Fernandez, C. & Boudouresque, C.F. (1998). Evaluating artificial diets for small *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Echinoderms*: San Francisco, Mooi & Telford (Eds). Balkema, Rotterdam. 657 p.
- Fernandez, C. & Boudouresque, C.F. (2000). Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fed different artificial food. *Marine Ecology Progress Series*, 204: 131-141.
- Fernandez, C. & Caltagirone, A. (1994). Growth rate of adult *Paracentrotus lividus* in a lagoon environment : the effect of different diet types. In B. David, A. Guille, J.P. Féral & M. Roux (Eds.). *Echinoderms trough time*. Rotterdam: Balkema: 655-660.
- Fernandez, C., Dombrowski, E. & Caltagirone, A. (1995). Gonadic growth of adult sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in rearing: the effect of different diet type. In Emson R., Smith A., Campbell A. (Eds.). *Echinoderms Research 1995*. Rotterdam: Balkema: 269-275.
- Fernández, C., Caltagirone, A. & Johnson, M. (2001). Demographic structure suggests migration of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a coastal lagoon. *J. Mar.Biol. Ass.*, 81: 361-362.
- Fernandez, C. & Pergent, G. (1998). Effect of different formulated diets and rearing conditions on growth parameters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Shellfish Research*, 17 (5): 1571-1581.
- Fernández, E., Lustres, V., César, J., Cadarso, C. & Roca, J. (2006). El ciclo gonadal del erizo de mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), en las costas de Galicia. *VIII Foro Marino*, 253 p.

- Fernández-Silva, I. (2008). *Saturación de mapa genético de melón con marcadores derivados de ESTs y estudio de QTLs implicados en desarrollo de fruto*. Tesis doctoral. Departamento de Genètica Vegetal del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG). Universidad de Lleida. 188 p.
- Fridberger, A., Fridberger, T. & Lundin, L.G. (1979). Cultivation of Sea Urchins of Five Different Species under Strict Artificial Conditions. *Zoon*, 7: 149-151.
- Fuji, A. (1967). Ecological studies on the growth and food consumption of Japanese common littoral sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz). *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 15 (2): 83-160.
- Gabin-Sánchez, C. & Lorenzo-de Dios, F. (1993). El Erizo de Mar: un Recurso con Futuro. *Aula del Mar de la Fundación Caixa Galicia*: 15-16.
- Gago, J. (2009). *Sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck 1816) eggs and endotrophic larvae: Potential of their use as marine larval fish first-feeding*. Tesis doctoral. Facultade de Ciências. Universidade de Lisboa. 153 p.
- Gaither, M.R.; Toonen, R.J.; Robertson, D.R.; Planes, S., Bowen, B.W. (2010). Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *J. Biogeogr.*, 37: 133-147.
- Gamble, J.C. (1965). Some observations of the behaviour of two regular echinoids. *Symp. Underwater Assoc. Malta, 1965*: 47-50.
- Gianguzza, P., Chiantore, M., Bonaviri, C., Cattaneo-Vietti, R., Vielmini, I. & Riggio, S. (2006). The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fisheries Research*, 81 (1): 37-44.
- Girard, D., Hernández, J.C., Toledo, K., Clemente, S. (2006). *Aproximación a la biología reproductiva del equinoideo Paracentrotus lividus (Lamarck 1816) en el litoral de Tenerife*. Libro de Resúmenes XIV SIEBM.
- Goebel, N., Barker, M.F. (1998). Artificial diets supplemented with carotenoid pigments as feeds for sea urchins. Mooi, R.; Telford, M. (Eds.) *Echinoderms*, Balkema, San Francisco: 667-672.
- Gonor, J.J. (1972). Gonad growth in the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) (Echinodermata: Echinoidea), and the assumptions of gonad index methods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 10: 89-103.

- González, N., Rey-Méndez, M., Pérez, Y., Bilbao, A., Louzara, G. y Domínguez, R. (2012). Innovación acuícola: compartiendo recursos mediante acuicultura multitrófica integrada. Conferencia V FIRMA, Cádiz 2012.
- González-Irusta, J.M. (2009). *Contribución al conocimiento del erizo de mar Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) en el mar Cantábrico: ciclo gonadal y dinámica de poblaciones*. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias y técnicas del agua y del medio ambiente. Universidad de Cantabria.
- González-Irusta, J.M., Goñi de Cerio, F., Canteras, J.C. (2009). Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (northern Spain): environmental effects. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 90 (4): 699-709.
- Gosselin, P., Jangoux, M. (1998). From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology*, 118: 31-43.
- Grosjean, P., Spirlet, C. & Jangoux, M. (1996). Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201:173-184.
- Grosjean, P., Spirlet, C., Gosselin, P., Vaitilingon, D. & Jangoux, M. (1998). Land-based closed cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea): a long term experiment at a pilot scale. *J. Shellfish Res.*, 17: 1523-1531.
- Grosjean, P. (2001). *Growth model of the reared sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)*. PhD Thesis. Université Libre De Bruxelles.
- Grosjean, P., Spirlet, C. & Jangoux, M. (2003). A functional growth model with intraspecific competition applied to a sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 60 (3): 237-246.
- Guettaf, M. & San Martin, G.A. (1995). Étude de la variabilité de l'indice gonadique de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinidae) en Méditerranée Nord-Occidentale. *Vie et Milieu*, 45 (2): 129-137.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1 (1): 55-63.
- Hagen, N.T. (1996). Echinoculture: from fishery enhancement to closed cycle cultivation. *World Aquac.*, 27 (4): 6-19.

- Hagen, N.T. (1998). Effect of food availability and body size on out-of-season gonad yield in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Journal of Shellfish Research*, 17: 1533-1539.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hammer, B.W., Hammer, H.S., Watts, S.A., Desmond, R.A., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L. (2004). The effects of dietary protein concentration on feeding and growth of small *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.*, 145: 1143-1157.
- Hammer, B.W., Hammer, H.S., Watts, S.A., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L. (2006). The effect of dietary protein and carbohydrate concentration on the biochemical composition and gametogenic condition of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *JEMBE*, 344: 109-121.
- Hansson, H.G. (2001). European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Echinodermata in: Costello, M. J. *et al.* (Eds.). *Collection Patrimoines Naturels*, 50: 336-351.
- Haya, D. (1990). *Biología y ecología de Paracentrotus lividus en la zona intermareal*. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.
- Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., Sala, E. (2004). Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Marine Biology*, 144: 1011-1018.
- Hereu, B. (2005). Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. *Marine Ecology*, 26: 54-62.
- Hinegardner, R.T. (1969). Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.*, 137: 465-475.
- Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Etter, P.D., Stiffler, N., Johnson, E.A., *et al.* (2010). Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genetics*, 6: e1000862.
- Iuri, V., Patti, F.P. & Procaccini, G. (2007). Phylogeography of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea): first insights from the South Tyrrhenian Sea. *Hidrobiología*, 580: 77-84.

- James, P.J. (2006a). The effects of wave and feeding disturbance on gonad enhancement of the sea urchin *Evechinus chloroticus* held in sea-cages. *Aquaculture*, 252: 361–371.
- James, P.J. (2006b). A comparison of gonad enhancement of the sea urchin *Evechinus chloroticus* in sea based and land based cages. *Aquaculture*, 253: 290-300.
- James, P.J., Heath, P. & Unwin, M.J. (2007). The effects of season, temperature and initial gonad condition on roe enhancement of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Aquaculture*, 270 (1-4): 115-131.
- Jeffs, A., Hooker, S. (2000). Economic Feasibility of Aquaculture of Spiny Lobsters *Jasus edwardsii* in Temperate Waters. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31 (1): 30-41.
- Jolicoeur, P. (1985). Flexible 3-parameter curve for limited or unlimited somatic growth. *Growth*, 49: 271-281.
- Karl, S.A.; Toonen, R.J.; Grant, W.S., Bowen, B.W. (2012). Common misconceptions in molecular ecology: echoes of the modern synthesis. *Mol. Ecol.* In press.
- Kawamura, H.e.a. (1984). On the natural seeds collection, intermediate culture, and release of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. *J. Hokkaido Fish. Exp. Stn.*, 41: 270-315.
- Keesing, J. K., Hall, K. C. (1998). Review of harvests and status of world sea urchin fisheries points to opportunities for aquaculture. *J. Shellfish Res.*, 17: 1597-1604.
- Kelly, M.S., Brodie, C.C., McKenzie, J.D. (1998). Somatic and gonadal growth of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin) maintained in polyculture with the Atlantic salmon. *J. Shellfish Res.*, 17: 1557-1562.
- Kelly, M. S. (2000). The reproductive cycle of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Echinodermata: Echinoidea) in a Scottish sea loch. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 80: 909-919.
- Kempf, M. (1962). Recherches d'écologie comparée sur *Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*. *Rec. Trav. Stn. Mar. Endoume, Fr.*; 25: 47-116.
- Kennedy, E.J., Robinson, S.M.C., Parsons, G.J., Castell, J. (2001). Studies on feed formulations to maximize somatic growth rates of juvenile green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquacult. Assoc. Can. Spec. Publ.*, 4: 68-71.
- Kirchhoff, N. T., Stephen, E., Brown, N. P. (2010). Out-of-season gamete production in *Strongylocentrotus droebachiensis*: Photoperiod and temperature manipulation. *Aquaculture*, 303: 77-85.

- Klinger, T.S., Hsieh, H.L., Pangallo, R.A. & Chen, C.P. and Lawrence, J.M. (1986). The effect of temperature on feeding, digestion and absorption of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: echinoidea). *Physiol. Zool.*, 59 (3): 332-336.
- Klinger, T.S., Lawrence, J.M. & Lawrence, A.L. (1994). Digestive characteristics of the sea-urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) fed prepared feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25 (4): 489-496.
- Lawrence, J.M. (1975). On the relationships between marine plants and sea urchins. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 13: 213-286.
- Lawrence, J.M. (2007). Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. J. M. Lawrence (Eds.). *Developments in aquaculture and fisheries science*, 37: 529 p.
- Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., Giese, A.C. (1966). Role of the gut as a nutrient-storage organ in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Physiological Zoology*, 39 (4): 281-290.
- Lawrence, J.M.; Lane, J.M. (1982). The utilisation of nutrients by post metamorphic echinoderms. In: M. Jangoux & J.M. Lawrence (Eds.). Echinoderm nutrition. Balkema Publ., Rotterdam: 331-371.
- Lawrence, J.M., Régis, M., Delmas, P., Gras, G. & Klinger, T.S. (1989). The effect of quality of food on feeding and digestion in *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: echinoidea). *Mar. Behav. Physiol.*, 15: 137-144.
- Lawrence, J.M., Fenaux, L., Corre, M.C., Lawrence, A. (1991). The effect of quantity and quality of prepared diets on production in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). Scalera-Liaci, L., Canicatti, C. (Eds.). *Echinoderm Research*, Balkema, Rotterdam: 107-110.
- Lawrence, J.M., Plank, T. & Lawrence, A. L. (2003). The effect of feeding frequency on consumption of food, absorption efficiency, and gonad production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134 (1): 69-75.
- Lawrence, J.M., Olave, S., Otaiza, R., Lawrence, A.L. & Bustos, E. (2007). Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28 (1): 91-96.
- Le Direach, L., Boudouresque, C.F., Antolic, B., Kocatas, A., Panayotidis, P., Pancicci, A., Semourd, R., Span, A., Zaquali, J., Zavodnik, D. (1987). Rapport sur l'exploitation des Oursins en Méditerranée. In: Boudouresque, GIS Posidonie,

- IFREMER (Eds.). *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*. Marseille: 199-220.
- Le Gall, P. (1987). La peche des oursins en Bretagne. In: Bouderesque, GIS Posidonie, IFREMER (Eds.). *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*. Marseille: 311–324.
- Le Gall, P. & Bucaille, D. (1987). Intérêt d'un élevage intensif de l'oursin violet, *Paracentrotus lividus*. In: *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*. In: Bouderesque, GIS Posidonie, IFREMER (Eds.). Marseille: 399–405.
- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R., Paulay, G. (1999). Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidarcis* in relation to land barriers and ocean currents. *Evolution*, 53: 806-817.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Littlewood, D.T.J., Smith, A.B., Clough, K.A., Emson, R.H. (1997). The interrelationships of the echinoderm classes: Morphological and molecular evidence. *Biol. J. Linn. Soc.*, 61:409-438.
- Liu, H., Kelly, M.S., Cook, E.J., Black, K., Orr, H., Zhu, J.X., Dong, S.L. (2007). The effect of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin larvae, I. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Aquaculture*, 264 (1-4): 247-262.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., Whittick, A. (2002). The effect of an artificial diet on the biochemical composition of the gonads of the sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Food Chemistry*, 79: 461-472.
- López, S., Turon, X., Montero, E., Palacin, C., Duarte, C. M. & Tarjuelo, I. (1998). Larval abundance, recruitment and early mortality in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). Interannual variability and plankton-benthos coupling. *Marine Ecology Progress Series*, 172: 239-251.
- Lowe, E.F. & Lawrence, J.M. (1976). Absorption efficiencies of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: echinoidea) for selected marine plants. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 21: 223-234.
- Lozano, J., Galera, J., Lopez, S., Turon, X., Palacin, C., Morera, G. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122(1-3): 179-192.

- Lustres-Pérez, V. (2001). *El erizo de mar: Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) en las costas de Galicia*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Maltagliati, F.; Di Giuseppe, G.; Barbieri, M.; Castelli, A., Dini, F. (2010). Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 910-923.
- McBride, S.C., Pinnix, W.D., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., Mulligan, T.M. (1997). The effect of temperature on production of gonads by the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* fed natural and prepared diets. *J. World Aquac. Soc.*, 28: 357-365.
- McBride, S.C., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., Mulligan, T.M. (1999). Ingestion, absorption, and gonad production of adult *Strongylocentrotus franciscanus* fed different rations of a prepared diet. *J. World Aquac. Soc.*, 30: 364-370.
- McBride, S.C., Price, R.J., Tom, P.D., Lawrence, J.M. & Lawrence, A.L. (2004). Comparison of gonad quality factors: color, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture*, 233(1-4): 405-422.
- McCarron, E., Burnell, G., Mouzakitis, G. (2009). Growth assessment on three size classes of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* using continuous and intermittent feeding regimes. *Aquaculture*, 288: 83-91.
- McCartney, M.A., Keller, G. & Lessios, A. (2000). Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology*, 9: 1391-1400.
- McClintock, J.B., Klinger, T.S., Lawrence, J.M. (1982). Feeding preferences of echinoids for plant and animal food models. *Bulletin of marine science*, 32 (1): 365-369.
- McLaughlin, G. & Kelly, M.S. (2001). Effect of artificial diets containing carotenoid-rich microalgae on gonad growth and color in the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin). *J. Shell. Res.*, 20 (1): 377-382.
- Míguez, L.J. (2009). *Equinodermos (Crinoideos, Equinoideos y Holoturoideos), litorales, batiales y abisales de Galicia*. Tesis doctoral. Estación de biología marina de 'A Graña', Facultad de Biología, U.S.C. 882 p.

- Míguez, L.J., Catoira, J.L. (1987). Primeras aportaciones sobre la dinámica y rendimiento gonadal de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) en la Ría de la Coruña. *Cuadernos marisqueros*, 12. Technical Report.: 717-722.
- Montero Torreiro, M.F. (2000). *Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar Paracentrotus lividus*, Lmk. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- Montero Torreiro, M.F., García Martínez, P. (2003). Seasonal changes in the biochemical composition of body components of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in Lorbé (Galicia, north-western Spain). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 83: 575-581.
- Mooi, R. & David. B. (1997). Skeletal homologies of echinoderms. *Paleont. Soc. Papers*, 3: 305-335.
- Mooi, R. & David. B. (1998). Evolution Within a Bizarre Phylum: Homologies of the First Echinoderms. *Amer. Zool.*, 38: 965-974.
- Moore, H.B. (1934). A comparison of the biology of *Echinus esculentus* in different habitats, Part I. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 19: 869-885.
- Nagai, Y. & Kaneko, K. (1975). Culture experiments on the sea urchin *Strongylocentrotus pulcherrimus* fed an artificial diet. *Mar. Biol.*, 29: 105-108.
- Niell, F.X. & Pastor, R. (1973). Relaciones tróficas de *Paracentrotus lividus* (Lmk) en la zona litoral. *Investigaciones pesqueras*, 37(1): 1-7.
- Nuez, J.; Carrillo, J.M. (2000). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Ojea, J.; Martínez-Patiño, D.; Nóvoa, S. y Catoira, J.L. (2008). Reproducción del erizo de mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en dos poblaciones naturales: mar Cantábrico (Cedeira) y océano Atlántico (Aguíño). *Foro Ac. Rec. Mar. Rías Gal.*, 11: 581-588.
- Ojea, J.; Martínez-Patiño, D.; Nóvoa, S. y Catoira, J.L. (2010). Índice de condición, ciclo gametogénico y composición bioquímica de gónadas de erizo de mar *Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816, en cuatro poblaciones naturales de Galicia. *Foro Ac. Rec. Mar. Rías Gal.*, 12: 523-529.
- Olave, S., Bustos, E., Lawrence, J.M., Cárcamo, P. (2001). The effect of size and diet on gonad production by the Chilean sea urchin *Loxechinus albus*. *J. World Aquac. Soc.*, 32: 210-214.

- Ouréns, R. (2007). *Patrones geográficos, poblacionales y estacionales en los parámetros reproductivos del erizo Paracentrotus lividus*. D.E.A., Universidad de la Coruña.
- Pais, A., Chessa, L.A., Serra, S., Ruiu, A., Meloni, G., Donno, Y. (2007) The impact of commercial and recreational harvesting for *Paracentrotus lividus* on shallow rocky reef sea urchin communities in North-western Sardinia, Italy. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 73: 589–597.
- Palacín, C., Giribet, G., Carner, S., Dantart, L. & Turon, X. (1998). Low densities of sea urchins influence the structure of algal assemblages in the western Mediterranean. *Journal of Sea Research*, 39: 281-290.
- Palero, F., Abelló, P., Macpherson, E., Gristina, M., Pascual, M. (2008). Phylogeography of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): Influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 708-717.
- Palumbi, S.R. (1994). Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 547-572.
- Palumbi, S.R. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13: S146-S158.
- Palumbi, S.R., Wilson, A.C. (1990). Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. *Evolution*, 44: 403-415.
- Palumbi, S. R., Grabowsky, G., Duda, T., Geyer, L. and Tachino, N. (1997). Speciation and Population Genetic Structure in Tropical Pacific Sea Urchins. *Evolution*, 51 (5): 1506-1517.
- Pallas, A. y Pan, M. (2000-2002). *Biología y gestión de pesquerías de recursos específicos en Galicia*. Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de Santiago de Compostela. 55 p.
- Pantazis, P.A., Kelly, M.S., Connolly, J.G., Black, D. (2000). Effect of artificial diets on growth, lipid utilization, and gonad biochemistry in the adult sea urchin *Psammechinus miliaris*. *J. Shell. Res.*, 19 (2): 995-1001.
- Pantazis, P.A. (2006). Carotenoid profiles of two echinoids from central Greece, *Psammechinus microtuberculatus* and *Echinus esculentus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37 (3): 339-344.
- Pawson, D.L. (2007). Phylum Echinodermata. *Zootaxa*, 1668: 749–764.

- Pearce, C.M., Daggett, T.L. & Robinson, S.M.C. (2002). Effect of protein source ratio and protein concentration in prepared diets on gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 214 (1-4): 307-332.
- Pearce, C.M., Daggett, T.L., Robinson, S.M.C. (2004). Effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 233 (1-4): 337-367.
- Pearse, J. (2006). Ecological Role of Purple Sea Urchins. *Science*, 314 (5801): 940-941.
- Pedrotti, M.L. (1993). Spatial and temporal distribution and recruitment of echinoderm larvae in the Ligurian Sea. *Journal of the Marine Biology Association of the UK*, 73: 513-530.
- Pennington, J.T. (1985). The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biological Bulletin*, 169: 417-430.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 25 (7): 1253-1256.
- Pulpeiro, E. & Lustres Pérez, V. (2001). *El ciclo gonadal del erizo de mar, Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816), en las costas de Galicia*. Departamento de Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.
- Quesada, H., Beynon, C.M., Skibinski, D.O.F. (1995). A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Pleistocene vicariance biogeography and secondary interdegradation. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 521-524.
- Quinteiro, J. (2010). *Filogenia Molecular, Estructura Poblacional y Trazabilidad Genética de Escómbridos (Pisces: Scombridae)*. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela. 295 p.
- Régis, M.B. (1979). Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux équinoïdes (*Paracentrotus lividus* (Lmk.) et *Arbacia lixula* L.) du Golfe de Marseille. *Thetys*, 9: 167-181.
- Rey-Méndez, M., Quinteiro, J., Tourón, N., Rodríguez-Castro, J., Rama Villar, A., González, N., Martínez, D., Ojea, J. y Catoira, J.L. (2009). Comparación de la evolución del índice gonadal de erizos de mar (*Paracentrotus lividus* Lamarck, 1816) de tamaño comercial, confinados en batea, respecto a los del medio natural. *XI Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. 247-254. J. Fernández-Casal, M. Rey-Méndez and A. Cerviño Eiroa (Eds.). O Grove. Pontevedra. España.

- Richards, F.J. (1959). A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.*, 10 (29): 290-300.
- Ricker, W.E. (1979). Growth rates and models. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.). *Fish physiology*, 8. Academic Press, New York. : 677-743.
- Rivas, P. (2009). Paleontología de invertebrados. M^a Luísa Fernández Chacón y Pascual Rivas (Eds.) Sociedad Española de Paleontología, Instituto Geológico y Minero de España, Universidad de Oviedo, Universidad de Granada. 524 p.
- Robinson, S.M.C., Colborne, L. (1998). Roe enhancement trials of the green sea urchin using an artificial food source. In: Mooi, R., Telford, M. (Eds.). *Echinoderms*: San Francisco, Balkema, Rotterdam: 803 p.
- Robinson, S. M. C.; Castell, J. D. & Kennedy, E. J. (2002). Developing suitable colour in the gonads of cultured green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 206: 289-303.
- Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A., López-Hernández, J., González-Castro, M.J., de la Cruz-García, C. & Simal-Lozano, J. (2001). Comparison of volatile components in fresh and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck) gonads by GC-MS using dynamic headspace sampling and microwave desorption. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 643-647.
- Sala, E. (1996). *The role of fishes in the organization of a Mediterranean sublittoral community*. Thèse Doctorat. Université d'Aix-Marseille II, Marseille.
- Sala, E. & Zabala, M. (1996). Fish predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 140: 71–81.
- Sala, E., Boudouresque, C. F., Harmelin-Vivien, M. (1998). Fishing, trophic cascades, and the structure of algal assemblages: evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos*, 82: 425–439.
- Sánchez-España, A.I., Martínez-Pita, I. & García, F.J. (2004). Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiología*, 519 (1-3): 61-72.
- Scheibling, R.E. & Stephenson, R.L. (1984). Mass mortality of *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata: Echinoidea) off Nova Scotia, Canada. *Marine Biology*, 78 (2): 153-164.

- Schlosser, S.C., Lupatsch, I., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L. & Shpigel, M. (2005). Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* fed algal and prepared diets during spring and fall. *Aquaculture Research*, 36 (10): 972.
- Schulze, A.D., Alabi, A.O., Tattersall-Sheldrake, A.R., Miller, K.M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256 (1-4): 50-73.
- Semroud, R., Kada, H. (1987). Contribution à l'étude de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) dans la région d'Alger (Algérie): indice de réplétion et indice gonadique. In *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles* (C.F. Boudouresque, Ed.), pp. 117-124. Marseille, France: GIS Posidonie Publications.
- Semroud, R. (1993). *Contribution à la connaissance de l'écosystème à Posidonia oceanica (L.) Delile dans la région d'Alger (Algérie): Etude de quelques compartiments*. PhD thesis. Institute des Sciences de la Nature, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Algeria.
- Senaratna, M., Evans, L.H., Southam, L. & Tsvetnenko, E. (2005). Effect of different feed formulations on feed efficiency, gonad yield and gonad quality in the purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. *Aquaculture Nutrition*, 11: 199–207.
- Shpigel, M., McBride, S.C., Marciano, S. & Lupatsch, I. (2004). The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 232 (1-4): 343-355.
- Shpigel, M., McBride, S.C., Marciano, S., Ron, S. & Ben-Amotz, A. (2005). Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 245 (1-4): 101-109.
- Shpigel, M., Schlosser, S.C., Ben-Amotz, A., Lawrence, A.L. & Lawrence, J.M. (2006). Effects of dietary carotenoid on the gut and the gonad of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 261 (4): 1269-1280.
- Smith, A.B., Hollingworth, N.T.J. (1990). Tooth structure and phylogeny of the Upper Permian echinoid *Miocidaris keyserlingi*. *Proc. Yorkshire Geol. Soc.*, 48: 47–60.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

- Spirlet, C., Grosjean, P. & Jangoux, M. (1998a). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 34: 69-81.
- Spirlet, C., Grosjean, P. & Jangoux, M. (1998b). Optimizing food distribution in closed-circuit cultivation of edible sea urchins (*Paracentrotus lividus*: Echinoidea). *Aquat. Living Resour.*, 11 (4): 273-277.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M. (2000). Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture*, 185 (1-2): 85-99.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M. (2001). Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquaculture Nutrition*, 7 (2): 91-99.
- Sprinkle, J. & Guensburg, T.E. (1997). Early radiation of echinoderms. *Paleont. Soc. Papers*, 3: 205-224.
- Starr, M., Himmelman, J.H., Therriault, J.C. (1990). Direct coupling of marine invertebrate spawning with phytoplankton blooms. *Science*, 247 (4946): 1071-1074.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium (SUGSP), Sodergren, E., Weinstock, G.M., Davidson, E.H., Cameron, R.A., Gibbs, R.A., Angerer, R.C., Angerer, L.M., Arnone, M.I., Burgess, D.R. *et al.* (2006). The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314: 941-952.
- Sumrall, C.D. (1997). The role of fossils in the phylogenetic reconstruction of Echinodermata. *Paleont. Soc. Papers*, 3:267-288.
- Sumrall, C.D., Sprinkle, J. & Guensburg, T.E. (1997). Systematics and paleoecology of Late Cambrian echinoderms from the Western United States. *Journal of Paleontology*, 71: 1091-1109.
- Symonds, R.C., Kelly, M.S., Caris-Veyrat, C., Young, A.J. (2007). Carotenoids in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Occurrence of 9'-cis-echinenone as the dominant carotenoid in gonad colour determination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148 (4): 432-444.
- Szulgit, G.K. & Shadwick, R.E. (1994). The effects of calcium chelation and cell perforation on the mechanical properties of sea urchin ligaments. In *Echinoderms through Time*. David, B., Guille, A., Féral, J. P. & Roux, M. (Eds.) Balkema, Rotterdam: 887-892.

- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 512-526.
- Tanaka, M. (1988). Eco-physiological meaning of parameters of ALOG growth curve. Publications Amakusa Marine Biological Laboratory. *Kyushu University*, 9: 103-106.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Thorpe, J.P., Solé-Cava, A.M. & Watts, P.C. (2000). Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hidrobiología*, 420: 165-184.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, T.M., Scott, T.M., Stone, F.E. (1990). Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 88: 351-362.
- Turon, X., Giribet, G., López, S., Palacín, C. (1995). Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 122: 193-204.
- Tyler, P.A., Grant, A., Pain, S.L., Gage, J.D. (1982). Is annual reproduction in deep-sea echinoderms a response to variability in their environment?. *Nature, Lond.*, 300: 747-750.
- Uehara, T., & Shingaki, M. (1985). Taxonomic studies in the four types of the sea urchin, *Echinometra mathaei*, from Okinawa, Japan. *Zool. Sci.*, 2: 1009.
- Uthicke, S., Benzie, J.A.H. (2003). Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Mol. Ecol.*, 12: 2635-48.
- Vadas, R. (1977). Preferential Feeding: An Optimization Strategy in Sea Urchins. *Ecological Monographs*, 47 (4): 337-371.
- Vale, L. (2010). *Caracterización de un marcador tipo RAPD asociado al sexo en el rodaballo (Scophthalmus maximus)*. Trabajo de grado. Departamento de genética, Universidad de Santiago de Compostela.
- Verhulst, P.F. (1838). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondance Mathématique et Physique*, 10: 113-117.

- Verling, E., Crook, A.C., Barnes, D.K.A. (2004). The Dynamics of Covering Behaviour in Dominant Echinoid Populations from American and European West Coasts. *Marine Ecology*, 25 (3): 191-206.
- Von Bertalanffy, L. (1938). A quantitative theory of organic growth (inquiries of growth laws II). *Hum. Biol.*, 10 (2): 181-213.
- Walker, C.W. & Lesser, M.P. (1998). Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Mar. Biol.*, 132: 663-676.
- Walker, C.W., Unuma, T., McGinn, N.A., Harrington, L.M., Lesser, M.P. (2001). Reproduction of sea urchins. In *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. In: Lawrence, J.M. (Ed.): 5-26. Amsterdam: Elsevier.
- Watterson, G.A. (1984). Allele frequencies after a bottleneck. *Theor. Popul. Biol.*, 26: 387-407.
- Ward, J. (1989) Patterns of settlement of spiny lobster (*Panulirus argus*) postlarvae at Bermuda. *Proc. Gulf Caribb. Fish Inst.*, 39: 255-264.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Williams, M.B. (1975). Darwinian selection for self-limiting populations. *Journal of Theoretical Biology*, 55: 415-430.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Williams, H. (2002). Sea Urchin Fisheries of the World: A Review of Their Status, Management Strategies and Biology of the Principal Species. Department of Primary Industries, Waste and Environment, Tasmania.
- Wilkie, I.C. (1984). Variable tensility in echinoderm collagenous tissues: A review. *Marine Behaviour and Physiology*, 11 (1): 1-34.
- Wilkie, I.C. (1988). Design for disaster: the ophiuroid intervertebral ligament as a typical mutable collagenous structure. In: Burke, R.D., Mladenov, P.V., Lambert, P., Parsley, R.L., (Eds). *Echinoderm biology*. Rotterdam: Balkema: 25-38.
- Woods, C.M.C., James, P.J., Moss, G.A., Wright, J., Siikavuopio, S. (2008). A comparison of the effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the sea urchin *Evechinus chloroticus* Valenciennes. *Aquaculture International*, 16: 49-68.

- Workman, G. (1999). A review of the biology and fisheries for purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus* Stimpson, 1857) and discussion of the assessment needs for a proposed fishery. Canadian Stock Assessment Secretariat Research, document 99/163. Fisheries and Oceans Canada, Ottawa.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28:114-138.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323–354.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Zamora, S. (2011). Equinodermos del Cámbrico de España: situación actual de las investigaciones y perspectivas futuras. *Estudios Geológicos*, 67 (1): 59-81.
- Zirpolo, G. (1927). Di una nuova Silicospugna del Golfo di Napoli (*Microcordyla asteriae* n. g. n. sp.). *Bolletino della Società dei Naturalisti in Napoli.*, 38 (18): 287-290.
- Zulliger, D.E., Tanner, S., Ruch, M., Ribí, G. (2009). Genetic structure of the high dispersal Atlanto-Mediterranean sea star *Astropecten aranciacus* revealed by mitochondrial DNA sequences and microsatellite loci. *Marine Biology*, 156: 597-610.

Páginas web.

- <http://www.atlasgeneticsoncology.org>.
- <http://www.bio.ub.es>.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- <http://www.birc.au.dk>.
- <http://www.astromia.com>.
- <http://www.proctomuseum.us>.
- http://www.prochile.cl/poex/aysen_erizos.pdf.
- <http://www.fao.org>.
- <http://www.pescadegalicia.com>.