INFORME FINAL
PROYECTO FIP 2001-24

"REPOBLAMIENTO DE BANCOS DE MACHA EN PLAYA "LAS MACHAS" DE ARICA, I REGIÓN"

UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE

Grupo de Ecología y Manejo de Recursos

Octubre 2003

INFORME FINAL
PROYECTO FIP 2001-24

"REPOBLAMIENTO DE BANCOS DE MACHA EN PLAYA "LAS MACHAS" DE ARICA, I REGIÓN"

Unidad Ejecutora

UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE
Grupo de Ecología y Manejo de Recursos

Jefe Proyecto: WOLFGANG STOTZ

Co-Autores: DOMINGO LANCELLOTTI
KARIN LOHRMANN
ELIZABETH VON BRAND
JAIME ABURTO
LUIS MARCELO CAILLAUX
MARCELO VALDEBENITO
LORETO RODRÍGUEZ
PABLO ARAYA
CLAUDIO CERDA

I. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto tuvo como objetivo general desarrollar protocolos de trabajo y de protección ambiental que permitieran establecer las condiciones en que se debieran realizar las actividades de repoblación de organismos bentónicos. Una vez desarrollados los protocolos debieron ser aplicados a través de una actividad de repoblamiento del recurso macha en el sector de "Playa Las Machas" en Arica. Con el fin de lograr este objetivo se diseñó una estrategia de análisis que implicó (*a*) resumir la información disponible en la literatura pertinente, (*b*) la realización de un *workshop* internacional y (c) el diseño de experimentos en laboratorio y terreno en relación a (*i*) riesgos de propagar plagas, enfermedades y parásitos, (*ii*) riesgos de propagar características genéticas que desde el punto de vista antropocéntrico sean indeseables, (*iii*) transporte de organismos bentónicos y (*iv*) liberación de estos.

La primera versión de los protocolos fue el resultado de las revisiones bibliográficas para cada uno de los cuatro tópicos. Esta fue discutida con profesionales de la SUBPESCA y generó un versión borrador utilizada como plataforma de discusión en el *workshop* internacional, "*INTERNATIONAL WORKSHOP RESTORATION OF BENTHIC INVERTEBRATE POPULATIONS: Genetics, Diseases & Ecology*". Este *workshop* fue realizado como parte del proyecto tendiente a conocer las experiencias realizadas mundialmente en el campo del repoblamiento, *ranching* y *stock enhancement*. De los resultados producto de las exposiciones de especialistas y de las rondas de discusiones, se generó una segunda versión de los protocolos los que fueron aplicados en una acción de repoblamiento del recurso macha en el sector Playa Las Machas de Arica. De la experiencia obtenida en la acción de repoblamiento y de las conclusiones llegadas en una segunda reunión con profesionales de la SUBPESCA, se logró una versión final de los protocolos que compatibilizó criterios científicos y administrativos. Para la operatividad de los protocolos se diseñó un procedimiento a ser aplicado por la Autoridad, llamado *Proceso para la*

Autorización de una Acción de Repoblamiento. En este proceso, se debiera documentar debidamente que la acción y estrategia de repoblamiento propuesta posee las bases técnicas, biológicas y ecológicas que aseguran el relativo éxito del repoblamiento.

La estrategia de repoblamiento usada en el presente proyecto fue el resultado de las revisiones bibliográficas y de las conclusiones que arrojaron las rondas de discusión con especialistas durante el *workshop*. Esto sugirió una acción de repoblamiento mediante individuos sexualmente maduros que maximizaran la probabilidad de disponibilidad de larvas en el medio. Una segunda estrategia estuvo basada en la utilización de larvas competentes producidas masivamente en ambiente controlado. En la aplicación de los protocolos, la única población de machas que por su cercanía y tamaño permitía el repoblamiento – Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo –, permitió minimizar el riesgo de propagar enfermedades de alto riesgo (no se detectaron microorganismos patógenos), permitió resguardar la integridad genética de la especie (poblaciones naturales con baja variabilidad), además de resguardar el ambiente en el traslado y en la liberación (el ambiente no fue intervenido).

La aplicación de los protocolos en su segunda versión fue óptima, por lo que la versión final sólo mejoró aspectos administrativos. Sin embargo, y de acuerdo a la estrategia de liberación diseñada, la acción de repoblamiento no entregó los resultados esperados. De lo obtenido en esta experiencia y de lo evidenciado en la literatura, los resultados alertan sobre el tipo de ambiente donde se realicen los repoblamientos y del éxito relativo de éstos.

II. ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN EJECUTIVO 1
II. ÍNDICE GENERAL 3
III. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS 5
IV. ÍNDICE DE ANEXOS 7
V. OBJETIVOS DEL PROYECTO 8
Objetivo General: 8
Objetivos Específicos: 8
VI. ANTECEDENTES GENERALES 9
VII. ACTIVIDADES REALIZADAS Y METODOLOGÍA 10
SECCIÓN I. PROTOCOLOS 11
Objetivo 1. 11
Objetivo 2. 11
Objetivo 3. 12
Objetivo 4. 12
1.1. Objetivo 1. Plagas, Enfermedades y Parásitos 12
1.1.1. Síntesis Bibliográfica 12
1.1.2. Resultado del workshop 16
1.1.3. Protocolo 16
PROTOCOLO I. Consideraciones para reducir los riesgos de diseminación de enfermedades, parásitos y epibiontes 19
1.2. Objetivo 2. Genética 21
1.2.1. Síntesis Bibliográfica 21
1.2.2. Resultado del workshop 24
1.2.3. Protocolo 25
PROTOCOLO II. Consideraciones para reducir los riesgos de afectar el patrimonio genético 27
1.3. Objetivo 3. Transporte de Organismos Bentónicos 28
1.3.1. Síntesis Bibliográfica 28
1.3.2. Resultado del workshop 29
1.3.3. Protocolo 29
PROTOCOLO III. Consideraciones para reducir los riesgos ambientales en el transporte de organismos bentónicos 31

1.4. Objetivo 4. Liberación de Organismos Bentónicos 33
1.4.1. Síntesis Bibliográfica 33
1.4.2. Resultado del workshop 42
1.4.3. Protocolo 43
PROTOCOLO IV. Consideraciones para reducir los riesgos de daño ambiental en la liberación y establecimiento de organismos bentónicos 43
1.5. Propuesta para la regulación de actividades de repoblamiento 45
Proceso para la autorización de una acción de repoblamiento 45
SECCIÓN 2. APLICACIÓN PROTOCOLOS 51
Objetivo 5. 51
2.1. Estrategia de Repoblamiento 51
2.2. Metodología 53
2.2.1. Potenciales Poblaciones Donantes 53
2.2.2. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo: enfermedades 54
2.2.3. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo: genética 55
2.2.4. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo: transporte 59
2.2.5. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo: liberación 67
2.3. Resultado de la aplicación de protocolos 73
2.3.1. Potenciales Poblaciones Donantes 73
2.3.2. Protocolo de Traslado: Enfermedades y Parásitos 80
2.3.3. Protocolo de Traslado: Caracteres Genéticos 82
2.3.4. Protocolo de Traslado: Transporte 85
2.3.5. Protocolo de Traslado: Liberación 88
2.3.6. Resultado de la experiencia piloto: repoblamiento con adultos 90
2.3.7. Resultado de la experiencia piloto: repoblamiento con larvas 95
2.3.8. Conclusiones Generales de la aplicación de los Protocolos y Experiencia Piloto 97
2.4. Conclusiones del Proyecto 97
2.5. Reconocimiento 98
SECCIÓN 3. OTRAS ACTIVIDADES COMPROMETIDAS 100
3.1. Reuniones bimensuales con la Subsecretaría de Pesca 100
3.2. Personal participante 101
SECCIÓN 4. LITERATURA CITADA 103

III. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas.

Tabla 1. Lista de Enfermedades chequeadas y organismos epibiontes registrados en la población donante de *Mesodesma donacium*.

Tabla 2. Frecuencia alélica de seis loci polimórficos determinados en las 5 poblaciones de *Mesodesma donacium*.

Tabla 3. Identidad genética en las 5 poblaciones de *Mesodesma donacium*.

Tabla 4. Distancia genética en las 5 poblaciones de *Mesodesma donacium*.

Tabla 5. Número de machas enterradas a diferentes horas a partir de cuando fueron empacadas.

Tabla 6. Resultados ANDEVA de tres factores, supervivencia de machas.

Tabla 7. Resultados ANDEVA de tres factores, tiempo de entierro de machas.

Tabla 8. Condición gonadal de la muestra de machas liberadas en Arica.

Tabla 9. Georreferenciación de las estaciones del monitoreo de Playa Las Machas de Arica, realizado el 29 de Marzo de 2003.

Tabla 10. Georreferenciación de las estaciones del monitoreo de Playa Las Machas de Arica, realizado el 15 de Mayo de 2003.

Tabla 11. Georreferenciación de las estaciones del monitoreo en el sector peruano, realizado el 16 de Mayo de 2003.

Figuras.

Figura 1. Mapa de Chile mostrando una representación esquemática de la distribución geográfica de los sectores visitados. Flechas indican los lugares de procedencia de las muestras para el estudio genético.

Figura 2. Corte histológico del céstodo *Rhodobothrium mesodesmatum* presente en las machas.

Figura 3. Ubicación, en la cara interna de valva, de la ampolla producida por la presencia de *Polydora bioccipitalis*.

Figura 4. Volumen proyectado en función de la longitud valvar en las 5 poblaciones de machas.

Figura 5. Razón largo/ancho en función de la longitud valvar en las 5 poblaciones de machas.

Figura 6. Razón largo/largo umbonal en función de la longitud valvar en las 5 poblaciones de machas.

Figura 7. Alto valvar en función de la longitud en las 5 poblaciones de machas.

Figura 8. Frecuencia de machas enterradas luego de ser empacadas por cuatro horas en mallas (gris oscuro) y cajas térmicas (gris claro).

Figura 9. Supervivencia en machas.

Figura 10. Velocidad de entierro en machas.

Figura 11. Corte histológico de gónadas de machas indicando la ocurrencia de desove. A, gónada masculina; B, gónada femenina.

IV. INDICE DE ANEXOS

Anexo I. Manual de Procedimientos.

Anexo II. *Workshop*.

Anexo III. Protocolos.

Anexo IV. Documentación Audiovisual del Repoblamiento.

Anexo V. Hatchery.

Anexo VI. Personal Participante.

V. OBJETIVOS DEL PROYECTO

El proyecto tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Desarrollar protocolos de trabajo y de protección ambiental, que permitan establecer las condiciones en que se deberán realizar las actividades de repoblación de organismos bentónicos, y aplicarlos a través de la iniciación del repoblamiento del recurso macha en el sector de “Playa Las Machas” en Arica.

Objetivos Específicos:

Desarrollar protocolos de trabajo que permitan minimizar los riesgos de propagar plagas, enfermedades y parásitos a través de actividades de transposición de organismos bentónicos.

Desarrollar protocolos de trabajo que permitan minimizar los riesgos de propagar a través de actividades de transposición características genéticas que desde el punto de vista antropocéntrico sean indeseables.

Desarrollar protocolos de transporte de organismos bentónicos con fines de transposición.

Desarrollar protocolos de liberación de organismos bentónicos y sus respectivas evaluaciones.

Aplicar los protocolos desarrollados en los objetivos anteriores para efectuar el repoblamiento del recurso macha en el sector “Playa Las Machas “ en Arica.

VI. ANTECEDENTES GENERALES

El Consejo de Investigación Pesquera, en la nonagésima tercera reunión del 18 de diciembre del 2001, decidió adjudicar el proyecto FIP Nº 2001-24: "Repoblamiento de bancos de macha en playa "Las Machas" de Arica, I Región", cuya convocatoria se publicó en el Diario Oficial del 20 de noviembre del 2001, en favor de la Universidad Católica del Norte. Habiéndose firmado los contratos correspondientes, se dio inicio al proyecto el 1 de Enero de 2002.

Este informe final, de acuerdo a lo establecido en los Términos Técnicos de Referencia aprobados para la realización del presente proyecto, contiene todos los resultados obtenidos en el proyecto. Ello son: (1) la versión final de los protocolos, producto (*i*) de las revisiones bibliográficas, (*ii*) de lo tratado en el *workshop* internacional, "*INTERNATIONAL WORKSHOP RESTORATION OF BENTHIC INVERTEBRATE POPULATIONS: Genetics, Diseases & Ecology*", realizado en Coquimbo entre los días 9 y 12 de noviembre de 2002, (*iii*) de la visión de la Subsecretaría de Pesca, aportada en las reuniones periódica, y (*iv*) de la experiencia lograda en la aplicación de una versión pre-definitiva de los protocolos en una experiencia piloto de repoblamiento de macha. Además, se incluye (2) una propuesta de los procedimientos a seguir en una actividad de repoblamiento y (3) los resultados de la experiencia piloto de repoblamiento de macha en la Playa Las Machas de Arica.

VII. ACTIVIDADES REALIZADAS Y METODOLOGÍA

Las actividades realizadas durante el proyecto, de acuerdo a la Propuesta Técnica y para cada uno de los objetivos específicos, son presentadas en dos secciones separadas. Una primera sección, SECCIÓN 1. PROTOCOLOS, hace referencia a los objetivos 1 al 4 y corresponde al desarrollo de los protocolos. Aquí se entregan las revisiones bibliográficas, las conclusiones finales de los talleres del workshop, la versión final de los protocolos y una propuesta para la regulación de las actividades de repoblamiento. La segunda sección, SECCIÓN 2. APLICACIÓN PROTOCOLOS, hace referencia al objetivo 5, detallando los resultados de la experiencia piloto de repoblamiento de machas y discusión del procedimiento seguido.

Además, el presente informe incluye otras dos secciones, SECCIÓN 3. OTRAS ACTIVIDADES COMPROMETIDAS y SECCIÓN 4. LITERATURA CITADA.

SECCIÓN 1. PROTOCOLOS

Las actividades por objetivos realizadas durante la ejecución del proyecto son las siguientes:

Objetivo 1. Desarrollar protocolos de trabajo que permitan minimizar los riesgos de propagar plagas, enfermedades y parásitos a través de actividades de transposición de organismos bentónicos.

Esto incluyó una revisión bibliográfica relativo al tema de enfermedades, entregando una síntesis del conocimiento actual que se tiene de las enfermedades de invertebrados marinos, con énfasis para las costas chilenas. En esta sección, se entrega la versión final del protocolo relativo a plagas, enfermedades y parásitos, lo que se origina como producto de una revisión de la literatura pertinente, de la realización del *workshop*, de las reuniones con profesionales de la SUBPESCA y de la aplicación de una versión pre-final del protocolo en una experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. Se incluye un manual describiendo las enfermedades más relevantes citadas en la literatura, además de las técnicas y procedimientos para su detección y evaluación.

Objetivo 2. Desarrollar protocolos de trabajo que permitan minimizar los riesgos de propagar a través de actividades de transposición características genéticas que desde el punto de vista antropocéntrico sean indeseables.

Esto incluyó una revisión bibliográfica relativo al tema genética, entregando una síntesis del conocimiento actual alcanzado en la genética de invertebrados marinos, con énfasis para las costas chilenas. En esta sección se entrega la versión final del protocolo relativo a características genéticas, lo que se origina como producto de la revisión de la literatura pertinente, de la realización del

workshop, de las reuniones con profesionales de la SUBPESCA y de la aplicación de una versión pre-final del protocolo en una experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. Se incluye un manual donde se describen los procedimientos y técnicas más usadas en el estudio de la genética poblacional.

Objetivo 3. Desarrollar protocolos de transporte de organismos bentónicos con fines de transposición.

Esto incluyó una revisión bibliográfica relativo al tema transporte, entregando una síntesis de las exigencias internacionales sobre las cuales se ha inspirado la actual normativa nacional que regula el traslado de especies hidrobiológicas y de protección ambiental. En esta sección se entrega la versión final del protocolo para al tema transporte, versión que se origina como producto de las revisiones, de la realización del *workshop*, de las reuniones con personal de la SUBPESCA y de la aplicación de una versión pre-final del protocolo en una experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. Se incluye una *addenda* con los artículos relevantes de la normativa nacional vigente que regula el traslado de especies hidrobiológicas.

Objetivo 4. Desarrollar protocolos de liberación de organismos bentónicos y sus respectivas evaluaciones.

Incluye una revisión bibliográfica relativo al tema de liberación, entregando una síntesis del conocimiento alcanzado a nivel internacional en las experiencias de liberación de animales marinos, abarcando tanto el repoblamiento, el aumento de *stocks* como el *ranching*. En esta sección se entrega la versión final del protocolo para al tema liberación de organismos bentónicos, versión que se origina como producto de las revisiones, de la realización del *workshop*, de las reuniones con profesionales de la SUBPESCA y de la aplicación de una versión pre-final del protocolo en una experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las

Machas de Arica. Finalmente, para este objetivo se desarrolló una propuesta de regulación de las actividades de repoblamiento.

A continuación se detalla el desarrollo por objetivos.

1.1. Objetivo 1. Plagas, Enfermedades y Parásitos.

1.1.1. Síntesis Bibliográfica.

Los parásitos y patógenos que han sido descritos en moluscos bivalvos de importancia comercial se encuentran en diversas regiones del mundo, aunque los estudios se concentran mayoritariamente en el hemisferio norte (ver Anexo I., título I.1.1, EPIZOOTIAS CONOCIDAS). Sólo algunos de estos parásitos generan una reacción defensiva por parte del huésped y sólo unos pocos producen mortalidades que pueden llegar al 100% de la población. Estas son conocidas en nuestra actual reglamentación ambiental vigente como "Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas" y clasificadas en Lista 1 (que no están presentes en Chile) y Lista 2 (que sí han sido registradas) (D.S. Nº 319 de 2001 del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción).

En Chile existe poca información publicada respecto a enfermedades en invertebrados y, a la fecha, no se ha descrito ningún patógeno que cause mortalidades en moluscos (Campalans, 2002; Lohrmann, 2002) o en crustáceos (Venegas, 2002). La escasa literatura existente es principalmente sobre parásitos metazoarios, como tremátodos o céstodos, viviendo en almejas (Osorio & Castillo, 1984), en lapas (Oliva, 1988; Oliva & Díaz, 1992) en locos (Cañas & Lozada, 1987) y en la macha (Bahamondes & López, 1962). Uno de los primeros estudios dirigidos a buscar posibles patógenos presentes en moluscos cultivados fue el Proyecto FIP 95/32 de la Universidad Católica de Valparaíso (Campalans, 2002). La información publicada de los resultados obtenidos de dicho proyecto da cuenta de neoplasia hemocítica en mitílidos (Campalans *et al*., 1998) y neoplasia en

glándula digestiva de la ostra chilena (Rojas *et al*., 1999). Se encontró, además, anomalías celulares en larvas de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) provenientes de hatchery (González *et al*., 1999). El hallazgo más importante de dicho proyecto fue un parásito hemocítico, probablemente del tipo Bonamia, en la ostra chilena, *Tiostrea chilensis* (Campalans *et al*., 2000). En Coquimbo, en la Universidad Católica del Norte se ha estado desarrollando catastros de parásitos en moluscos sanos, especialmente en ostiones (Lohrmann *et al*., 2000; Lohrmann *et al*., 2002).

La aparente ausencia de patógenos en la costa chilena puede deberse en parte a condiciones diferentes de nuestras aguas que desfavorecerían el desarrollo de patógenos y a la lejanía física de los lugares con mayor cantidad de patógenos, frenando, así, la "globalización" en este ámbito. Sin embargo, es necesario notar el menor número de estudios realizados.

Revisando los huéspedes de los distintos parásitos se puede apreciar que las ostras son el grupo de moluscos con mayor número de enfermedades serias. Una de las explicaciones que se podría dar para este hecho, es que las ostras han sido cultivadas y trasplantadas desde tiempos muy antiguos, mucho antes que las demás especies comerciales. Para *Crassostrea virginica* existen antecedentes de transporte desde el Atlántico medio hacia Nueva Inglaterra en el año 1830. También fue llevada a la costa oeste y a Europa en los años 1870. Ostras planas europeas fueron llevadas a Nueva Inglaterra partiendo en 1949, y desde allí hacia la costa oeste durante 12 años (Elston, 1986; Ford, 2001).

Cuando se trasladan animales desde un lugar a otro existen tres posibilidades: (*i*) que pueden llegar enfermedades con el stock importado, (*ii*) que enfermedades presentes en el *stock* nativo pueden pasar al importado o (*iii*) que los híbridos resultantes de la cruza entre el *stock* nativo y el importado puedan presentar, ya sea, una mayor susceptibilidad o una mayor resistencia hacia un patógeno determinado (Sindermann, 1990). En general, se toman bastantes

precauciones respecto del traslado de especies exóticas o en el traslado de un país a otro. Sin embargo, en un mismo país, si se trasladan animales desde una zona geográfica a otra, se puede favorecer el desarrollo de enfermedades.

Todos los moluscos tienen algún parásito, sin embargo, un parásito causante de epizootia puede que lo haga sólo en parte del rango de distribución del huésped. También, puede haber una barrera geográfica que le impida expandirse. Un ejemplo de esto es lo ocurrido con el patógeno *Perkinsus marinus*, que causa importantes mortalidades en la ostra *Crassostrea virginica*. Esta ostra fue trasladada hacia el norte de la costa este de USA, donde no estaba el parásito. Sin embargo, debido a un período de calentamiento del agua de mar, se dieron las condiciones para que éste prosperara (Ford 1996).

Un parásito que no es muy frecuente en una especie, y sobre la cual no tiene un efecto aparente, puede ser patogénico para otra especie que nunca haya estado en contacto con ese parásito y en la cual puede causar mortalidades (Ford, 2001). Un ejemplo de esto es lo ocurrido con el ostión japonés *Mizuhopecten yessoensis*, introducido en Canadá. Esta especie sufre mortalidades debido a *Perkinsus qugwadi*, un protozoo que no se presenta en Japón, y cuyo huésped debe ser una especie nativa en Canadá la cual aún no ha podido ser encontrada (Blackbourn *et al*., 1998). No sólo los patógenos conocidos pueden ser un riesgo para trasladar moluscos, ya que al no existir estudios suficientes, ni en cantidad ni en extensión de tiempo, hace suponer que nuevos patógenos emergerán (Hine, 1996).

Un manual, donde están descritas las enfermedades citadas para organismos bentónicos (principalmente moluscos y crustáceos) y los métodos y técnicas para su determinación y evaluación, se entrega en el Anexo I bajo los títulos I.1.1. EPIZOOTIAS CONOCIDAS y I.1.2. DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES, respectivamente.

1.1.2. Resultado del *workshop*.

El tema enfermedades fue abordado en la sesión inicial del *workshop*, *Consideration of diseases & pests* por el doctor invitado Dr. Eugene Burresson. Otras exposiciones de expertos invitados fueron de la Dra. Mariel Campalans y Dra. Claudia Venegas, incluyendo la charla de la Dra. Karin Lohrman miembro de nuestro equipo de trabajo. Los resúmenes ampliados de estas y otras exposiciones y presentaciones en paneles, relacionadas con este tema, fueron incluidos en el libro de resumen del *workshop* (ver Anexo II para el libro de resumen y los resultados generales del *workshop*).

De los temas tratados en los talleres, y de las discusiones que generaron, se logró establecer consideraciones para una actividad de repoblamiento, las que fueron incluidas en el desarrollo del protocolo para el tema de enfermedades. Estas son:

i) Un patólogo deberá certificar la presencia/ausencia de enfermedades en los individuos de la población a utilizar en un repoblamiento.
ii) Basado en el punto anterior, evaluar si la transposición de esos individuos es recomendable o no.
iii) Para evaluar se deberá utilizar la mejor herramienta disponible y posible de financiar (histología, estudios moleculares, experimentos, etc.).
iv) Considerar el protocolo original como recomendación a ser analizada, no como regulación.

1.1.3. Protocolo.

La versión final del protocolo tendiente a minimizar los riesgos de propagar plagas, enfermedades y parásitos durante la transposición de organismos bentónicos, fue el producto de una serie de sesiones de discusión. La primera versión de este protocolo, desarrollada con la participación exclusiva de nuestro equipo de trabajo y basada en la revisión bibliográfica, fue discutida con los

profesionales de la SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. Una primera conclusión apuntó a simplificar los criterios y exigencias en los procedimientos que aparecen en esa primera versión, transformando al protocolo en una herramienta operacional que facilite y no frene las acciones de transposición, sin que esto vaya en desmedro del ambiente. Como consecuencia, la principal restricción a incorporar en el protocolo será la exigencia explícita de no autorizar el repoblamiento con animales que provengan de bancos naturales, de lugares o zonas donde se haya registrado la presencia de "Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas" clasificadas en Lista 1 y/o Lista 2 (D.S. Nº 319 de 2001 del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción). Esta sesión dio lugar a una versión revisada de la primera versión del protocolo, la que fue incluida como tema central en la sesión de discusión del *workshop*, *Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding diseases and pest*. Una siguiente sesión *Presentation of results to plenary and roundtable*, permitió delinear la segunda versión del protocolo, reafirmando los conceptos de simplicidad, no obstante, alertando sobre los impactos ambientales y económicos negativos a que nos expondríamos al introducir enfermedades de alto riesgo.

En sesiones previas del *workshop*, el especialista invitado Dr. Eugene Burreson insistió en la falta de conocimiento sobre enfermedades, plagas y parásitos, a pesar del buen dominio alcanzado en algunos patógenos. En conclusión, lo que corresponde es restringir la transposición de animales desde zonas con presencia de enfermedades catalogadas en Lista 1 y/o en Lista 2, aunque esta enfermedad esté presente en el lugar a repoblar. Esto, por el desconocimiento del grado de patogeneidad de las probables estirpes que un patógeno pueda presentar. Así mismo, cualquier procedimiento tendiente a eliminar el patógeno desde los animales a transponer es inadmisible, al no existir ningún procedimiento que asegure la eliminación total de estos patógenos, a excepción de la incineración del huésped.

De las exposiciones de los invitados expertos Dras. Mariel Compalans y Claudia Venegas, se concluye que tanto las epizootias conocidas, su distribución, como los procedimientos para la detección y control, corresponden a aquellas recopiladas e informadas en el Anexo I, títulos I.1.1. EPIZOOTIAS CONOCIDAS y I.1.2. DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES.

Relativo a los parásitos y plagas, estos últimos referidos como aquellos organismos epibiontes que pueden causar un impacto negativo al ambiente al actuar como especies invasoras, se concluyó que debieran estar incluidos en los criterios generales a considerar en un repoblamiento. Sin embargo, estos no debieran estar normados dentro de un protocolo. De este modo, la información entregada en el segundo informe de avance e incluida en el Anexo I de este informe bajo los títulos I.2.1. EPIBIONTES CONOCIDOS y I.2.2. DIAGNÓSTICO DE LOS EPIBIONTES, debe ser considerada de referencia dentro del procedimiento que regulará la actividad de repoblamiento. Todos estos aspectos fueron considerados en la segunda versión del protocolo.

La segunda versión del protocolo fue aplicada en la experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. La aplicación del protocolo fue operacionalmente eficiente y su resultado será tratado en la SECCIÓN II. Esta versión también fue discutida con los profesionales de la SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. Hubo un general acuerdo en la estructura y operatividad del protocolo, aunque se precisó en algunos aspectos técnicos y en una relativa mayor flexibilidad de este, bajando el *n* mínimo muestreal de 150 a 60 animales. Sin embargo, se puso especial énfasis en los canales necesarios entre la aplicabilidad del protocolo y la propuesta que regulará la actividad de repoblamiento. La versión final del protocolo tendiente a minimizar los riesgos de propagar plagas, enfermedades y parásitos a través de actividades de transposición de organismos bentónicos, se entrega a continuación (ver Anexo III. para una compilación de todos los protocolos con algunas observaciones y/o definiciones técnicas):

PROTOCOLO I.
CONSIDERACIONES PARA REDUCIR LOS RIESGOS DE DISEMINACIÓN DE ENFERMEDADES, PARÁSITOS Y EPIBIONTES

Criterios para Calificar Individuos en una Acción de Repoblamiento

1.1. En el caso que el sitio a repoblar posea la condición de Zona Libre de Enfermedades de Alto Riesgo (en el marco de un Programa Sanitario oficial de Vigilancia), el repoblamiento debe ser realizado solamente con los organismos originarios de un lugar con igual calificación.

1.2. Sin perjuicio de lo anterior, se deberá realizar un análisis macroscópico e histológico de un $N \geq 60$ animales de la población donante e igual número de la población receptora, con el objeto de identificar y cuantificar todos los parásitos y epibiontes de ambas poblaciones. Un $N = 60$ permitirá detectar la presencia de una enfermedad, parásito y/o epibionte hasta un mínimo de un 5% de prevalencia, a un nivel de confianza del 95%.

1.3. Una vez realizado el estudio como en 1.2., el repoblamiento no será autorizado si una o más especies de parásitos se detectan en los animales originarios de la población donante y que no se encuentran en la población receptora. En el caso que la o las especies de parásitos se encuentren en ambas poblaciones, el traslado sólo será permitido si la prevalencia en la población donante es igual o menor que la registrada en la población receptora.

1.4. En el caso que en la población donante se detecte cualquier patógeno considerado en Lista 1, según la clasificación de enfermedades de alto riesgo (CEAR) vigente (no registrado hasta ese momento para el país), la población no podrá ser utilizada como donante.

1.5. En el caso que el repoblamiento se lleve a cabo con individuos producidos en laboratorio, el repoblamiento será autorizado solamente cuando el cultivo en el ambiente controlado no haya sufrido ningún evento epizoótico, aunque haya sobrevivido gran parte de la camada.

1.6. Sin perjuicio de lo anterior, todo traslado se deberá regir, además, por la normativa sanitaria vigente para tales efectos.

1.2. Objetivo 2. Genética.

1.2.1. Síntesis Bibliográfica.

Parte del desarrollo dentro de determinadas especialidades de la genética ha sido consecuencia de la extracción indiscriminada que han sufrido determinados recursos pesqueros, llevando a los *stocks* e, incluso, a especies a límites peligrosos de abundancia. La necesidad de identificar poblaciones locales o *stock* pesquero ha significado recurrir a la *genética de poblaciones*, utilizando técnicas de electroforesis de isoenzimas. El rango de acción de este tipo de conocimiento se ha extendido actualmente a la comparación de poblaciones naturales, de cultivo e, incluso, para detectar tempranamente posibles pérdidas de variabilidad. La necesidad de optimizar la producción de carne, i.e. mediante inducción a triploidía (3n), ha implicado el desarrollo de estudios de la *citogenética*. El desarrollo de programas de mejoramiento genético centra el interés en la *genética cuantitativa*. También se ha observado un aumento en el área de la *genética molecular*, incluyendo la utilización de técnicas de DNA mitocondrial para comparar poblaciones, PCR para secuenciar genes e intentos de sintetizar proteínas presentes en invertebrados que pueden tener importancia en farmacología o medicina.

En Chile, el desarrollo de la genética en invertebrados, y especialmente en moluscos, ha sido bastante precario, notándose en la última década un incremento

significativo de trabajos realizados. Esto último explicado por el incremento de los cultivos. Sin embargo, la información publicada en revistas de distribución nacional e internacional es escasa, encontrándose la mayor cantidad de la información en informes técnicos (algunos de circulación restringida), seminarios, resúmenes de presentaciones a congresos y tesis.

En Chile se observa la misma tendencia internacional de desarrollo en la genética de invertebrados marinos. Esto se asocia al incremento en el valor comercial de alguna especies y a la expansión de los cultivos de éstos, en donde los moluscos poseen una mayor relevancia. La investigación genética de moluscos nativos se ha centrado, principalmente, en las especies que actualmente son cultivadas en forma masiva, o que se espera sean cultivadas en un futuro cercano. Entre estas se encuentra el ostión del Norte, *Argopecten purpuratus*, la ostra chilena, *Tiostrea chilensis*, el choro zapato, *Choromytilus chorus*, la macha, *Mesodesma donacium*, y el loco, *Concholepas concholepas*. Sin embargo, hay trabajos, principalmente en el área de citogenética, que son de especies nativas sin importancia comercial. En todos ellos se han realizado estudios puntuales de algunos aspectos de la g*enética de poblaciones*, destacando los trabajos que utilizan electroforesis de isoenzimas, realizados por Guíñez & Galleguillos (1985) y Guíñez *et al*. (1986) en la ostra chilena; von Brand & Kijima (1990), von Brand (1991), Galleguillos y Troncoso (1990, 1991) y Jollán *et al*. (1994) en el ostión del Norte; Guíñez *et al.* (1992) en el loco; Troncoso & Galleguillos (1989, 1990) en el choro zapato; y Galleguillos *et al*. (1985) en la macha. Algunos estudios de rasgos fenotípicos, sus patrones de herencia y su correlación con parámetros de crecimiento fueron realizados en la ostra chilena por Figueroa & Winkler (1991), Figueroa (1992), Figueroa *et al*. (1992), en el ostión del Norte por von Brand *et al*. (1986), Garrido (1990), Wolff & Garrido (1991), Wolff *et al*. (1991), Winkler *et al*. (1992), Estévez (1992), Jollán (1993). Estudios *citogenéticos* han sido realizados en el ostión del Norte (von Brand *et al*., 1990), en la ostra chilena (Ladrón de Guevara, 1991; Ladrón de Guevara *et al*., 1992; 1993), en el choro zapato (Palma-Rojas *et al*., 1997), en la almeja *Semele solida* (Guerra *et al*., 1992) y en los

nudibranquios *Phidiana inca* (Godoy *et al*., 1994; 1997; Godoy, 1998) y *Anisodoris rudberghi* (von Brand *et al*., 1996; Palma-Rojas *et al*., 1997; Godoy, 1998), de la macha *Mesodesma donacium* (Amar *et al*., 1998; Amar, 2001) y del caracol papa *Sinum cymba* (de la Barra & von Brand, 1999). Manipulación cromosómica ha sido realizada con éxito en el ostión del Norte. *Argopecten purpuratus*, utilizando *shock* térmico (Canello & Paredes, 1991; Canello *et al*., 1992) o mediante citocalasina - B (Ladrón de Guevara *et al*., 1992; Winkler *et al*., 1993), o 6-DMAP (Bodini & von Brand, 1996; Bodini 1998; Bordagaray, 1998; von Brand *et al*., 1997, 1998; von Brand & Godoy, 1998; Riquelme *et al*., 1998; von Brand et al., 1998 Proyecto FONDEF D98I1044; von Brand et al., 2003, Proyecto FONDEF D02I1095) como agentes inductores a la triploidía. En la ostra japonesa *Crassostrea gigas* se utilizó *shock* de calor (Tapia, 1998). Estudios de selección y cruzamientos dirigidos, así como determinación de heredabilidad para algunos rasgos morfométricos han sido realizados en la ostra chilena por Toro (1991, 1992), Toro & Newkirk (1990, 1991); determinación de interacciones genotipo - ambiente en *Mytilus chilensis* (Paredes *et al*., 1992), en ostra del pacífico *Crassostrea gigas* (Cortés, 1999) y resultados de un proyecto de selección y cruzamientos dirigidos para obtener variedades en ostión del Norte (Neira, com.pers.). La Pontificia Universidad Católica de Chile, en el área de Genética Molecular, inició los estudios en el loco, estudiando el DNA mitocondrial (González *et al*., 1991).

El desarrollo del área de la genética en Chile se enfrenta, así como otras áreas de Investigación, con el problema fundamental del financiamiento. Esto es aún más crítico ya que muchos estudios genéticos requieren de un apoyo adecuado de infraestructura y personal técnico calificado costoso. Un ejemplo es la *genética molecular*. Esta muestra un fuerte desarrollo a nivel internacional, sin embargo, y como línea de desarrollo, aún no ha podido ser implementada en forma apropiada en Chile debido a la inversión requerida. Por otro lado, existen áreas de la genética que no requieren de tanto equipamiento, como lo es la *citogenética*, incluyendo los estudios cromosómicos en Taxonomía. En Chile se

han hecho estudios citogenéticos en sólo 8 especies de moluscos y se están realizando los estudios en 3 especies de fisurélidos (lapas). Estos estudios básicos de cariotipos pueden ser realizados con la implementación básica de un laboratorio de Biología.

Genética y Repoblamiento. Frente a un programa de repoblamiento, la diversidad genética de la especie pasa a ser el material base que le permite responder rápidamente a los cambios que ocurren en el ambiente. La adaptación a estos cambios puede no ser adecuada si ha ocurrido una pérdida de esta variabilidad genética (Frankham *et al*., 2002; Smith, 1994); por esto, es de gran importancia realizar estudios que permitan conocer la estructura genética de las poblaciones si se desea realizar programas de repoblamiento. A mayor variabilidad genética, más posibilidades de éxito hay en el repoblamiento porque el ambiente actúa como seleccionador, a favor o en contra, sobre genotipos determinados. La electroforesis en gel de almidón es una técnica que permite estudiar la variabilidad genética existente en individuos y, a través de esta información (frecuencias alélicas), determinar la estructura genética de la población. Para ello es necesario buscar marcadores enzimáticos específicos para una especie y/o población determinada (Smith, 1994). Al conocer la constitución genética de una población (estudio de línea base), es posible usar esta información para comparar poblaciones, correlacionar ciertas características individuales y poblacionales con la presencia de marcadores enzimáticos o proteicos determinados. Del resultado de estos estudios se obtendrán los elementos de juicio necesarios en el momento de obtener los futuros reproductores y/o el número necesario de animales para un repoblamiento exitoso.

1.2.2. Resultado del *workshop*.

El tema genética fue abordado en la sesión inicial *Genetic considerations* por el doctor invitado Dr. Standish Allen. Además, se contó con la contribución de la Dra. Elisabeth von Brand, miembro de nuestro equipo de trabajo. No se

recibieron otras contribuciones de los asistentes al *workshop* relativo a la genética, lo cual es reflejo de la escasez de conocimiento de esta temática en programas de repoblamiento. Los resúmenes ampliados de estas presentaciones fueron incluidos en el libro de resumen del *workshop* (ver Anexo II para el libro de resumen y los resultados generales del *workshop*).

De los temas tratados en los talleres, y de las discusiones que generaron, se logró establecer consideraciones para una actividad de repoblamiento, las que fueron incluidas en el desarrollo del protocolo para el tema de genética. Estas son:

i) Usar individuos de la misma población a recuperar (repoblamiento basado en animales producidos en hatchery) o de la(s) población(es) más cercana(s) disponible(s) (repoblamiento basado en animales producidos en hatchery o transposición de adultos).

ii) En ambos casos de repoblamiento, basado en animales producidos en hatchery o transposición de adultos, un especialista deberá evaluar, con la mejor herramienta disponible y posible, de acuerdo a costos, la integridad genética de las poblaciones en cuestión (donante y a repoblar).

iii) Considerar el protocolo pertinente como recomendación y no como regulación.

1.2.3. Protocolo.

La versión final del protocolo, tendiente a minimizar los riesgos asociados con aspectos genéticos durante la transposición de organismos bentónicos, fue el producto de una serie de sesiones de discusión. La primera versión de este protocolo, desarrollada por nuestro equipo de trabajo y basada exclusivamente en las revisiones bibliográficas, fue discutida con los profesionales de la SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. Las conclusiones también apuntaron a simplificar los criterios y exigencias en los

procedimientos que aparecen en esa primera versión, facilitando las acciones de transposición pero minimizando los riesgos ambientales y de la población a fundar. Como consecuencia, la principal restricción a incorporar en el protocolo será la exigencia explícita que el repoblamiento sólo será autorizado dentro del rango de distribución de la especie en cuestión. Aquí, se privilegiarán los bancos donantes localizados dentro de la macro-población que abarca la zona geográfica donde se encuentra el lugar a repoblar. Además, se debiera incluir el mayor número de poblaciones locales donantes, donde no se hará selección alguna de individuos (sobre uno o más caracteres) minimizando, así, la pérdida de variabilidad genética (reducción de la heterocigosidad). Esta sesión dio lugar a una versión revisada de la primera versión del protocolo, la que fue incluida como tema central en la sesión de discusión del *workshop*, *Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding genetic considerations*. Una siguiente sesión *Presentation of results to plenary and roundtable*, permitió delinear la segunda versión del protocolo, reafirmando los conceptos de simplicidad. Por lo complejo que puede ser la definición de la o las macro-poblaciones presentes en el rango de distribución de la especie a repoblar, por lo variable en el tiempo que pueden ser sus límites, por el eventual colapso que pudieran haber alcanzado las poblaciones locales en una extensa zona y/o por la disponibilidad de bancos donantes, sólo deberá ser normada la exigencia de repoblar dentro del rango de distribución de la especie en cuestión.

En una de las primeras sesiones del *workshop*, el especialista invitado Dr. Standish Allen reafirmó la necesidad de maximizar la variabilidad en acciones de repoblamiento, especialmente cuando el repoblamiento se realiza con animales producidos en *hatchery*. En general, las técnicas descritas en el manual del Anexo III, título II.1.1. TÉCNICAS GENÉTICAS, que acompañaron a la primera versión del protocolo, son los necesarios para definir límites poblacionales y determinar variabilidad genética, pero no debieran ser normadas. Sin embargo, dicho manual y las consideraciones de variabilidad e identidad debieran formar parte de los criterios generales a considerar en un repoblamiento.

En una acción de repoblamiento, la selección de caracteres deseables e indeseables desde el punto de vista antropocéntrico no debiera ser conducente. Esto sólo será considerado cuando el carácter indeseable sea una consecuencia de la presencia de una enfermedad, parásito o plaga. En este contexto, el título II.1.2. MORFOMETRÍA del Anexo III establece las expresiones fenotípicas medibles y la metodología apropiada para su cuantificación y deben ser incluidas dentro de los criterios generales a considerar en un repoblamiento.

La segunda versión del protocolo fue aplicada en la experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. La aplicación del protocolo fue operacionalmente eficiente y su resultado será tratado en la SECCIÓN II. Esta versión también fue discutida con los profesionales de la SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. Hubo un general acuerdo en la estructura y operatividad del protocolo, precisando en los canales necesarios entre la aplicabilidad del protocolo y la propuesta que regulará la actividad de repoblamiento. La versión final del protocolo tendiente a minimizar los riesgos de afectar el patrimonio genético a través de actividades de transposición de organismos bentónicos, se entrega a continuación (ver Anexo III. para una compilación de todos los protocolos con algunas observaciones y/o definiciones técnicas):

PROTOCOLO II.
CONSIDERACIONES PARA REDUCIR RIESGOS DE AFECTAR EL PATRIMONIO GENETICO

Criterios para Calificar Individuos en una Acción de Repoblamiento

2.1. La elección de una población donante debiera favorecer el criterio de identidad. Es decir, debiera pertenecer al grupo de poblaciones que evidencian un real o potencial mayor intercambio genético entre ellas y cuya extensión geográfica incluye el sitio a repoblar.

2.2. Si dentro de una misma macropoblación existen varias poblaciones potencialmente donantes, el repoblamiento se debiera realizar con los individuos del mayor número posible de poblaciones.

2.3. En el caso que el repoblamiento sea realizado mediante larvas o juveniles producidos en el laboratorio, se debiera utilizar el mayor número posible de reproductores para asegurar el mantenimiento de la heterocigosidad de las poblaciones donantes.

1.3. Objetivo 3. Traslado de Organismos Bentónicos.

1.3.1. Síntesis Bibliográfica.

El Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos, editado por la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2001), posee protocolos de traslado cuyos procedimientos y exigencias son de una común aceptación. Estos incluyen: (*i*) las recomendaciones para el transporte, las que considera las disposiciones generales y particulares para vehículos y contenedores, las disposiciones particulares para el transporte aéreo de animales acuáticos, la desinfección y otras medidas sanitarias, el tratamiento del agua de transporte y el vertido de material infectado; (*ii*) las medidas zoosanitarias que se deben aplicar antes de la salida y a la salida; (*iii*) las medidas zoosanitarias que se deben aplicar durante el trayecto entre el lugar de salida en el país exportador y el lugar de llegada en el país importador; (*iv*) las medidas a aplicar en los puertos fronterizos en el país importador; y (*v*) las medidas zoosanitarias que se deben aplicar a la llegada. Cada uno de estos aspectos de alguna u otra forma fueron considerados en el desarrollo de la actual legislación chilena, y resumidos en el Reglamento Sobre las Medidas de Protección, Control y Erradicación de las Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas (D.S. Nº 319 de 2001).

En el Título I de esta reglamentación, Disposiciones Generales, en su Artículo 1 define los objetivos esenciales en el desarrollo de los protocolos, donde textualmente leemos "... se establece las medidas de protección y control para evitar la introducción de enfermedades de alto riesgo que afectan a las especies hidrobiológicas, sea que provengan de la actividad de cultivo con cualquier finalidad o en su estado silvestre, ...". Y, a continuación, en su segundo párrafo obliga a: "Las disposiciones del presente reglamento se aplicarán a las actividades de cultivo, transporte, repoblamiento y transformación de especies hidrobiológicas ...". Finalmente, en el Título X, Del Transporte de Especies Hidrobiológicas y sus Muestras, enumera en el Artículo 48º las condiciones de transporte y traslado dentro del territorio nacional de especies hidrobiológicas vivas o muertas, en cualquier estado de desarrollo. En consecuencia, esta normativa debe ser exigida explícitamente en cualquier procedimiento o protocolo con fines de repoblamiento.

1.3.2. Resultado del *workshop*.

El tema transporte sólo fue abordado en la sesión de discusión del *workshop*, *Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding transport*, por el MSc. Domingo Lancellotti, miembro de nuestro equipo de trabajo. Sin embargo, en la mayoría de las charlas y rondas de discusión estuvo implícito el tema higiene y legislación vigente en lo que a transposición de organismos se refiere. Se logró establecer que el tema transporte ya cuenta con una serie de regulaciones, simplemente el protocolo debiera ajustarse a ellas.

1.3.3. Protocolo.

La presente versión del protocolo de transporte de organismos bentónicos con fines de transposición, fue también el resultado de sesiones de discusión. La primera versión de este protocolo, desarrollada por nuestro equipo de trabajo y basada en las revisiones bibliográficas, fue discutida con los profesionales de la

SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. Las conclusión apuntaron a simplificar los criterios y exigencias en los procedimientos que aparecen en esa primera versión, concentrándose en los aspectos administrativos y sanitarios. Como principal sugerencia, el protocolo de traslado debiera compatibilizar con la actual legislación, especialmente cuando se está en presencia del Reglamento Sobre las Medidas de Protección, Control y Erradicación de las Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas (D.S. Nº 319 de 2001). Esta sesión dio lugar a una versión revisada de la primera versión del protocolo, la que fue incluida como tema central en la sesión de discusión del *workshop*, *Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding transport*. Esta y la siguiente sesión *Presentation of results to plenary and roundtable*, permitieron concluir que los conceptos considerados en la exposición son los que corresponden para este tipo de protocolo.

La segunda versión del protocolo fue aplicada en la experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. La aplicación del protocolo ayudó a optimizar los aspectos administrativos relativo a las normativas vigentes, los que fueron considerados en la versión final del protocolo y en la propuesta para regular las acciones de repoblamiento. Los resultados de la aplicación del protocolo serán tratados en la SECCIÓN II. La segunda versión del protocolo también fue discutida con los profesionales de la SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. En esta ocasión se precisó en los canales necesarios entre la aplicabilidad del protocolo, la propuesta que regulará la actividad de repoblamiento y la legislación actual. Se incorporó explícitamente en el protocolo el Título XIV, Disposiciones Varias, del Reglamento Sobre las Medidas de Protección, Control y Erradicación de las Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas (D.S. Nº 319 de 2001). Este título, en el Artículo 72 dice “Se prohibe la disposición, en los cursos de agua de especies hidrobiológicas que presenten signos clínicos de enfermedad y los ejemplares muertos ...”. En el Articulo 73, en su segundo párrafo, dice: “En

los casos en que la resolución de la Subsecretaría de Pesca que autoriza el repoblamiento con especies hidrobiológicas vivas, provenientes del medio natural, establezca como obligación la acreditación del estado sanitario de los ejemplares, ...” haciendo referencia explícita en la ausencia de enfermedades de alto riesgo sujetas a un programa sanitario de vigilancia, control y erradicación. Finalmente, otros artículos de este título, como el 75 y el 77 también son relevantes para un traslado con un mínimo de riesgo.

La versión final del protocolo tendiente a reducir riesgos ambientales en el transporte de organismos bentónicos, se entrega a continuación (ver Anexo I, para una *addenda* con los artículos relevantes de la normativa nacional vigente que regula el traslado de especies hidrobiológicas, y Anexo III para una compilación de todos los protocolos con algunas observaciones y/o definiciones técnicas):

PROTOCOLO III.
CONSIDERACIONES PARA REDUCIR RIESGOS AMBIENTALES EN EL TRANSPORTE DE ORGANISMOS BENTÓNICOS

Traslado de Adultos, Juveniles y Larvas.

3.1. El traslado, en todos sus aspectos y etapas, debe considerar la preocupación por el bienestar del organismo

3.2. El traslado de recursos hidrobiológicos en cualquiera de sus etapas, estados y origen deberá contar con la documentación pertinente (guía de despacho, guía de libre transito, certificado sanitario, etc.).

3.3. Las medidas a considerar en el traslado de una especie con fines de repoblamiento deberán estar acorde con el título X y XIV del "Reglamento sobre las medidas de protección, control y erradicación de las

enfermedades de alto riesgo para las especies hidrobiológicas", sin perjuicio de los programas sanitarios generales que se elaboren.

3.4. Sin perjuicio de lo anterior, el traslado de animales deberá incluir un plan del traslado, donde se establecerá:

(*a*) itinerario del traslado (ruta y medio de transporte a utilizar)
(*b*) lugar de disposición de organismos muertos
(*c*) lugar de disposición de residuos líquidos
(*d*) desinfección del medio de transporte
(*e*) desinfección/eliminación de residuos sólidos

3.5. De ser requerido, el plan de traslado anterior deberá establecer, durante el transcurso del viaje, el reemplazo de la matriz líquida en donde se encuentran los organismos o del agua utilizada para mitigar la desecación sufrida por ellos. Ello implica que, al momento de liberar los organismos, estos ya estarán inmersos en agua proveniente del lugar receptor o que estos ya hayan sido bañados con agua de ese lugar. En el caso que el lugar donante tenga un historial de plagas, el recambio de agua durante el traslado será siempre obligatorio. En toda ocasión, el reemplazo de la matriz líquida y los baños deberán realizarse en tierra firme y lejos de cursos de aguas.

3.6. El traslado deberá incluir un plan de contingencia en caso que suceda una eventual mortandad masiva durante el traslado, indicando:

(*a*) potenciales lugares de disposición de los organismos muertos a lo largo de la ruta de traslado
(*b*) desinfección/eliminación de residuos líquidos o sólidos
(*c*) desinfección del medio de transporte
(*d*) la toma de muestras para determinar la(s) causa(s) de mortalidad

1.4. Objetivo 4. Liberación de Organismos Bentónicos

1.4.1. Síntesis Bibliográfica.

El colapso de las pesquerías bentónicas generalmente es el resultado de la sobre explotación a la que están sometidas las poblaciones. Sin embargo, algunas perturbaciones naturales (i.e. ENSO) o eventos epizoóticos (i.e. *Perkinsus marinus* y/o *Haplosporidium nelsoni*) pueden llegar a disminuir e, incluso, extinguir localmente los recursos. Ya sea por intereses económicos, culturales, recreacionales y/o de conservación, la recuperación de estos recursos pasa ser una necesidad.

Uno de los ejemplos que resume la mayor cantidad de esfuerzos en la recuperación de poblaciones de organismos bentónicos ha sido la pesquería de la ostra nativa de la costa atlántica de Estados Unidos, *Crassostrea virginica*. Explotada comercialmente desde comienzos del Siglo XX, el recurso sufrió un fuerte deterioro dado los niveles de extracción alcanzados, además, de los efectos destructivos de dos enfermedades producidas por los protozoarios *Haplosporidium nelsoni* y *Perkinsus marinus* (Mann, 2000). La especie conforma arrecifes a los cuales se asocian una gran diversidad de animales, muchos de ellos de importancia económica. Producto del proceso de cosecha, la explotación de este recurso implicó, también, la destrucción del hábitat (Lenihan & Micheli, 2000). Así, la recuperación de esta pesquería no sólo fue concebida para cosechar sino que también, y en forma simultánea, con fines de conservación, de restauración de hábitat y mejora de la calidad del agua, esto último por la gran capacidad de filtrado que presenta esta especie (Breitburg *et al*., 2000). El restablecer estos hábitat ha resultado en un aumento en el reclutamiento de una gran variedad de otras especies, algunas de importancia comercial como lo son los cangrejos del género *Cancer* (Dumbauld *et al*., 2000).

Bartol & Mann (1997) evidenciaron un aumento en el *stock* parental de ostras luego de establecer artificialmente arrecifes tridimensionales construido en base a conchas vacías de ostras. Los arrecifes fueron instalados en el intermareal bajo dentro de un sistema de estuarios (Bahía Chesapeake), sin la adición de reproductores. Los arrecifes fueron dejados "madurar" naturalmente, con la premisa de que las ostras podrían reclutar desde larvas provenientes del plancton. Inicialmente, las mayores densidades de ostras alcanzadas dentro de los arrecifes fueron alrededor de 20 – 25% de las logradas en arrecifes comerciales en plena producción. Posteriormente, y con la adición de reproductores traídos desde arrecifes naturales donde las poblaciones, aunque diezmadas, habían sobrevivido luego de reiteradas enfermedades, Southworth & Mann (1998) demostraron un aumento en la producción de ostras alrededor de un orden de magnitud, especialmente en los subestuarios donde la circulación facilitaba la retención larval. Southworth & Mann (1998) sugirieron que la combinación de arrecife y adición de reproductores puede proveer un método acelerado para el restablecimiento de las poblaciones de ostras, potenciándose la calidad del ambiente y la disponibilidad larval.

Basado en las primeras experiencias de repoblamiento de ostras, se han construido una serie de arrecifes artificiales agregando al ambiente toneladas de conchas de bivalvos vacías, sin adicionar larvas (O'Beir *et al*., 2000). Sin embargo, y para el éxito final del repoblamiento, resultó no ser menor la calidad del nuevo hábitat ofrecido, como lo fue la elección del tipo de concha, la altura del arrecife (capas de conchas) y el nivel mareal. De este modo, el repoblamiento debe pasar primero por restablecer la estructura física del hábitat y luego por el aumento del *stock* desovante. Muchas veces esta estructura física es aportada por especies que, más que recursos pesqueros, debieran ser consideradas piedras angulares de ecosistemas (Mann, 2000).

Otro ejemplo es del recurso almeja *Mercenaria mercenaria*, una especie de bivalvo habitante de la zona intermareal y submareal de la costa este de Estados

Unidos. MacFarlane (1998) resumió el historial del programa de manejo municipal del recurso para las costas de Orleans. El control municipal local de la pesquería de este molusco y su programa de manejo (repoblamiento), iniciado en 1942, evolucionaron desde el transplante de los *stocks* nativos al uso de semilla producida en *hatchery*, estas últimas compradas por los municipios a empresas particulares. Las diferentes técnicas de producción (cultivo) utilizadas para este propósito han logrado un máximo de liberación de 1 millón de semillas anualmente, donde la toma de decisiones dentro de la estrategia de manejo ha estado basada en la supervivencia de las semillas y no en otras respuestas, como podría ser el crecimiento.

En New England, Estados Unidos, el recurso almeja también soporta una gran pesquería comercial/recreacional, en donde las administraciones municipales han implementado una serie de herramientas para mantener los *stocks* públicos. Dentro de estas, fue incluido un programa de repoblamiento mediante juveniles cultivados en laboratorio (semillas). En una experiencia basada en 23 liberaciones y que incluyó varias localidades, fueron liberadas un promedio de 1,4 millones de semillas (± 355.000) de un largo de concha promedio de 15,9 mm (± 1,4). Los resultados arrojaron una pérdida promedio anual del 44%. En esto, las supervivencias estuvieron en el rango de 49% y 25% después de un año. La mayor causa de pérdida fue atribuida a la depredación por parte de cangrejos, aunque algunas especies de estrellas de mar y caracoles también fueron importantes depredadores (Walton & Walton, 2001).

Los programas de repoblamiento del recurso almeja no han contemplado una restauración previa del ambiente natural donde habita esta especie. Básicamente, y si bien el proceso de extracción del recurso implica una perturbación, el impacto de la cosecha no tendría un efecto importante sobre el hábitat (aunque no ha sido rigurosamente establecido; Walton & Walton, 2001). De este modo, la liberación se produce depositando directamente en el fondo

marino los animales producidos en *hatchery*, en los mismos lugares donde naturalmente habitan.

En el estado de Florida, Estados Unidos, el recurso almeja, *Mercenaria* spp., en conjunto con el recurso ostión, *Argopecten irradians*, han sido afectados ya sea por una sobre explotación, degradación del medio ambiente y/o desarrollo urbano. En la actualidad ambos recursos están sometidos a programas de recuperación (Arnold, 2001). Una estrategia de restauración usada en común para de los *stocks* de estas especie es la siembra de juveniles obtenidos masivamente en el laboratorio. Estos son sembrados en cajas o directamente en los mismos lugares desde donde provinieron los *stocks* parentales diezmados. Sin embargo, otras dos estrategias han sido utilizada en el recurso *Mercenaria* spp.

La almeja *Mercenaria mercenaria* ha sido exitosamente transplantada en áreas cuyas poblaciones colapsaron por sobre explotación y deterioro ambiental (Arnold, 2001). Varios miles de individuos adultos fueron extraídos, mediante métodos tradicionales de cosecha, desde áreas abiertas a la pesca y liberados en áreas cerradas a dicha pesquería. Junto con evaluar supervivencia y crecimiento, el objetivo final fue el concentrar masivamente individuos adultos, reproductivamente maduros, para que desovaran e incrementaran la eficiencia de la fertilización, aumentando, así, la probabilidad de obtención de larvas competentes (Southworth & Mann, 1998; Arnold, 2001). Mientras que el éxito de este objetivo aún no ha sido establecido, las almejas mostraron baja mortalidad y permanecieron en los lugares de liberación.

El repoblamiento de *Mercenaria* spp. también fue concebido mediante una *inyección larval* (Arnold, 2001). Un total aproximado de 250 millones de larvas producidas en laboratorio fueron liberadas directamente a la columna de agua de la bahía *Indian River Lagoon*. En la bahía, el recurso almeja estaba disminuido y en el momento de la liberación no se encontraban larvas de *Mercenaria*

mercenaria en el plancton. Luego de cinco días de la liberación, y previo a la metamorfosis, se registró una cantidad de 3 a 4 veces más larvas de *Mercenaria mercenaria* que las registradas en otras ocasiones (muestreo facilitado por la prueba de identificación genética género-específica; Frischer *et al*., 2000). Aunque el éxito final de esta experiencia aún no se ha evaluado, los autores están convencido que el bajo costo en la producción masiva de larvas y su alta permanencia en el plancton hacen que la estrategia de *inyección larval* represente una gran posibilidad de repoblar extensas áreas de hábitats explotables a corto plazo (Arnold, 2001).

El aumento de los *stoks* pesqueros mediante la liberación de juveniles cultivados en *hatchery* ha resultado ser una opción atractiva para las autoridades políticas y pesqueras, opción que, no obstante, debiera ser adaptada y rigurosamente evaluada antes de implementar proyectos de gran envergadura. En una experiencia a gran escala llevada a cabo en Australia e Indonesia con el gastrópodo "topshell" *Trochus niloticus*, se evaluó la hipótesis de que los *stocks* resembrados producían mayores cosechas con respecto a los lugares en que no había ocurrido siembra. La mayoría de los juveniles murieron o desaparecieron dentro de unos pocos meses de la liberación y los *stocks* resembrados no experimentaron aumentos relativo a los controles (Crowe *et al*., 2002). La principal causa de mortalidad fue atribuida a la depredación por peces. Una solución práctica al problema de la depredación pareció ser la liberación de juveniles de la mayor talla posible. Muchos estudios apuntan a que, en la liberación de animales con fines de repoblamiento, se obtendría una mayor supervivencia mientras mayor es el tamaño que alcanzan los animales, esto es, escape a la depredación por talla, i.e. el ostión de Islandia *Chlamys islandica* (Arsenault & Himmelman, 1996; ver también discusión en Crowe *et al*., 2002).

Para un programa de liberación masivo de animales producidos en ambiente controlado – *hatchery* –, la liberación de juveniles grandes puede llegar a ser impracticable en términos económicos. En su revisión, Hilborn (1998)

claramente establece que el aumento de los *stocks* no siempre es económica ni técnicamente viable, y debería ser evaluado con respecto a otras estrategias de manejo, tales como protección de hábitat, regulación pesquera o acceso restringido. Sin embargo, en *stocks* que son críticamente pequeños o están localmente extinguidos, la única opción posible pasaría por el repoblamiento mediante semillas producidas en *hatchery*. Por supuesto, esto no puede ser realizado a menos que los *stocks* resembrados sean protegidos (Hilborn, 1998).

Stoner & Davis (1994), Peterson *et al*. (1995) y Barbeau *et al*. (1996) han reconocido que la depredación es un factor que puede limitar dramáticamente el éxito de los programas públicos de sembrado mediante semillas. Stoner & Ray (1993) observaron en el gastrópodo *Strombus gigas* que la liberación en grandes densidades reducía el riesgo de depredación, mientras que Barbeau *et al*. (1996) no encontraron incremento en el número de depredadores en respuesta al incremento de la densidad en el ostión *Placopecten magellanicus*. Sin embargo, y debido a la variación a pequeña escala en la supervivencia de juveniles de *Trochus niloticus*, Castell (1997) sugiere que sería mejor disminuir este riesgo mediante la liberación sobre una gran área en vez de concentrarlos en un área pequeña. Similar estrategia ha sido propuesta para abalones (Schiel, 1993). Un factor mediando esta interacción predador–presa sería la disponibilidad de refugio (McShane, 1991). De este modo, los ejemplos divergentes en las respectivas estrategias de liberación estarían siendo condicionados por la estructuración del hábitat donde está ocurriendo la liberación.

El éxito de un programa de repoblamiento dirigido a poblaciones locales está en demostrar un reclutamiento exitoso asociado con el *stock* parental restablecido (Mann, 2000). El cómo y cuándo repoblar no es un problema trivial aunque se visualizan algunas estrategias. La eficiencia de un desove se maximiza mediante la liberación simultánea de gametos dentro de densas agregaciones (Levitan, 1991; Levitan *et al*., 1992). Como la fecundidad individual se incrementa con la talla, densas agregaciones de animales de gran tamaño deberían ser la

meta del repoblamiento, debido que ello ayudará proveyendo una estabilidad a largo plazo al maximizar la provisión de larvas (Mann, 2000).

Aunque la calidad del hábitat juega un papel importante en el reclutamiento (ver ejemplo en ostras), existe suficiente evidencia de que el suministro larval influye en el reclutamiento local (Stoner *et al*., 1998a). Todas las poblaciones que producen larvas pelágicas pueden sufrir, en algún grado, la pérdida de sus propágulos por medio de las corrientes de deriva (deriva larval), sin embargo, la taza de depredación durante el asentamiento y/o reclutamiento puede ser tan alto y llegar a producir un efecto comparable a la deriva larval (Woodin, 1976; André *et al*., 1993; Osman & Whitlatch, 1995; Gosselin & Qian, 1997; Stoner *et al*., 1998b). En suma, una serie de procesos pre- y post- asentamiento interactúan de una manera tal que dificultan predecir el reclutamiento local (Olafsson *et al*., 1994; Eggleston & Armstrong, 1995; Hunt & Scheibling, 1997; Wahle & Incze, 1997). Aquí, el rol de microdepredadores, i.e., cangrejos xánthidos, algunas especies de poliquetos (Ray-Culp *et al*., 1997) e, incluso, miembros de la meiofauna (Watzin, 1983) pueden llegar a ser un factor limitante para el éxito de los recién asentados. Por supuesto, este conjunto de procesos opera en el ambiente con o sin repoblamiento, sin embargo, la disponibilidad de larvas/reclutas en una población disminuida o en un programa de recuperación no es comparable a la encontrada en poblaciones fuera de riesgo, sugiriendo que en acciones de repoblamiento la incertidumbre del reclutamiento se maximiza (Mann, 2000).

Si bien la depredación y calidad del hábitat son factores limitantes para el éxito de la liberación o reclutamiento, la dispersión experimentada por los animales liberados o recientemente asentados puede estar sobre-estimando los efectos de la depredación. La dispersión es un proceso constante en el ambiente marino (Menge & Sutherland, 1987) y pareciera ser de mayor dinamismo en comunidades de fondos blandos, dado que la macroinfauna varía de manera sustancial y, muchas veces, debido completamente a las dinámicas de dispersión post–reclutamiento (Commito *et al*., 1995; Thrush *et al*., 1996; Leniham & Micheli,

2001). En estos ambientes, además, poco es lo que se conoce sobre el papel que juegan los factores hidrodinámicos en regular la distribución de las especies, en regular las condiciones sedimentarias (pero ver Hoefel & Reniers, 2003; Stive & Reiniers, 2003) y en la interacción entre ambos (Leniham & Micheli, 2001). Aunque se han implementado algunas técnicas para maximizar el éxito de encuentro de los animales liberados, i.e. con detectores de metales, concebidos principalmente para especies que habitan ambientes estructurados/crípticos o que pertenecen a la infauna (Crowe *et al*., 2001), su aplicación a gran escala resulta poco viable por los costos y tiempo demandado.

***Mesodesma donacium*:** El recurso *Mesodesma donacium* (Lamarck, 1818) habita las playas de arena de la costa expuesta de Chile. Es una especie dioica con periodos de desove anuales y semianuales, los que dependen de las variaciones ambientales locales, principalmente temperatura del agua y disponibilidad de alimento (Tarifeño, 1980; Filun, 1992). La larva permanece alrededor de 32 días en la columna de agua antes del asentamiento. Los juveniles se encuentran de preferencia en la zona de lavado (*swash zone*), presentando una clara separación con los adultos que ocupan la zona de rompientes (*surf zone*) (Jaramillo *et al*., 1994; Ortiz & Stotz, 1996). Estos, no obstante, pueden alcanzar los 15 m de profundidad (Tarifeño, 1980). La segregación podría deberse al posible escape de los juveniles a la depredación por parte de los adultos (en el momento de asentarse) o a una competencia por explotación.

Adultos y juveniles no se encuentran en ambientes con bajas salinidades (Ortiz & Stotz, 1996) y evitan las zonas con sedimentos finos y alto contenido de materia orgánica (Jaramillo *et al*., 1994; Miranda, 2001). Si bien estas condiciones están asociadas a ciertos sectores dentro de una playa o bahía, en ocasiones pueden llegar a generalizarse como consecuencia de eventos naturales, como lo es El Niño. A este último, se le atribuye directa (i.e. temperatura, salinidad, alimento) o indirectamente (i.e. turbidez por bajada de ríos) la desaparición de

poblaciones enteras y colapso de las pesquerías locales (Arntz & Valdivia, 1985; Miranda, 2001).

Dentro de su distribución horizontal, *Mesodesma donacium* presenta una distribución en parche. Esto no se relacionaría con cambios en el tamaño del grano de arena y sugiriere cambios en las características del hábitat a escalas intermedia, i.e. formación/desaparición de barreras (Jaramillo *et al*., 1994). A escalas mayores, los cambios en la morfodinámica de las playas provocan el transporte masivo de arena a lo largo de la costa, situación que causaría una emigración masiva de animales hacia aguas más profundas (Jaramillo *et al*., 1994). Esto ocurre en períodos cortos de tiempo, asociados a épocas invernales. Similares cambios en la distribución batimétrica de la macha han sido observados en la zona de Coquimbo (Stotz *et al*., 2002). En Marzo de 2002, el *stock* adulto de la población del Área de Manejo Peñuelas A se ubicaba desde la zona de rompientes hacia la playa, no registrado la presencia de animales a mayores profundidades. Para Octubre, la mayor abundancia de adultos fue encontrada pasada la zona de las rompientes, profundidades donde se registró una gran cosecha durante el período invierno-primavera. Sin embargo, la cosecha de macha en la zona de lavado fue igualmente importante a través de todo el año, aunque los animales tendieron a ser de menor talla que los extraídos de las zonas más profundas.

Como todos las especies de bivalvos que habitan la zona de rompientes, la macha prefiere “arenas móviles” evitando los sitios protegidos a la acción de oleaje donde el sedimento tiende a compactarse (Tarifeño, 1980; McLachlan, 1996). Defeo *et al*. (1986) encontró que *Mesodesma mactroides* modifica su profundidad de enterrado de acuerdo con la variación estacional de temperatura. Esta especie ajusta su tolerancia a la temperatura mediante la selección de microhábitats dentro del sedimento. Similar comportamiento se ha observado en otras especies de bivalvos asociadas a la zona de rompientes, i.e. *Donax vittatus* y

Donax trunculus (Ansell *et al*, 1980), comportamiento que también podría presentar la macha.

Aunque la pesquería de la macha con frecuencia colapsa localmente (Stotz, 2002), no existen antecedentes en publicaciones científicas que describan acciones de repoblamiento y menos estrategias de liberación. Sin embargo, su hábitat resulta ser bastante definido y predecible lo que facilitaría la elección de sectores de costa para eventuales repoblamientos. Por otro lado, el recurso macha ha sido por décadas evaluado utilizando tanto los mismos procedimiento de cosecha de buzos y orilleros (manos y pies) como a través de *cores*. Si bien no existe una exacta estimación del probable escape de la macha a los distintos artes de muestreo, las estimaciones de *stocks* poblacionales realizadas con *cores* han resultado ser muy similares a las obtenidas a través de los "desembarques" de los orilleros, esto con respecto a las estimaciones realizadas con cuadratas-extracción manual. Con *cores*, además, las estimaciones de cuotas de extracción han resultado ser bastante precisas (Boot, 2003).

1.4.2. Resultado del *workshop*.

En el *workshop* no se abordó el tema de liberación como tal, sino que se realizó una sesión denominada "consideraciones biológicas y ecológicas para el repoblamiento". Esta sesión permitió delinear el proceso de formalización de una *propuesta para la regulación de las actividades de repoblamiento*, procedimiento que será abordado en el punto 1.5.

Sin embargo, de los temas tratados en los talleres, y de las discusiones que generaron, se logró establecer algunas consideraciones que fueron incluidas en el desarrollo del protocolo para el tema liberación de organismos bentónicos. Estas fueron:

i) Usar la mejor información disponible

ii) Usar la mejor herramienta disponible o posible de financiar (experimentos)

iii) Evaluar los posibles efectos de manipulaciones necesarias para ayudar al establecimiento de los individuos de interés (remoción de competidores, depredadores, etc.).

iv) Evaluar el éxito/fracaso y los efectos secundarios de la actividad de repoblamiento. Esto con el fin de ir aprendiendo de las experiencias que se hagan.

1.4.3. Protocolo.

La presente versión del protocolo tendiente a reducir riesgos de daño ambiental en la liberación y establecimiento de organismos bentónicos, fue el producto de una serie de sesiones de discusión. La primera versión de este protocolo, desarrollada por nuestro equipo de trabajo y basada en la revisión bibliográfica, fue discutida con los profesionales de la SUBPESCA, Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. Se concluyó que el normar acerca de un protocolo de liberación debe ser con el espíritu de convertirlo en una herramienta operacional que facilite y no frene las acciones de transposición. Básicamente, el proceso de liberación será específico para cada recurso y hábitat en particular, requiriendo un conocimiento acabado de la ecología y biología de la especie en cuestión. Así, la principal consideración en este tipo de protocolo debiera asegurar un adecuado conocimiento de la especie a transponer. Esta sesión dio lugar a una versión revisada de la primera versión del protocolo, la que fue incluida como tema central en la sesión de discusión del *workshop*, *Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding seeding or release*. Una siguiente sesión *Presentation of results to plenary and roundtable*, permitió delinear la segunda versión del protocolo, donde el diseño de una actividad de repoblamiento debiera formar parte de un programa más globalizador, en donde la estrategia de manejo junto a medidas preventivas debieran estar por sobre las medidas paliativas.

La segunda versión del protocolo fue aplicada en la experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica. La aplicación del protocolo fue más conceptualmente que operacionalmente eficiente, procedimientos que fueron discutidos y perfeccionados en la reunión con los profesionales de la SUBPESCA. Los resultados de la aplicación del protocolo en la experiencia piloto serán tratados en la SECCIÓN II. En la reunión con los profesionales de la SUBPESCA, también participaron las Sras. Georgina Lembeye y Ana María Skarmeta y Sr. Gustavo San Martín. En esta ocasión junto con precisar en los canales necesarios entre la aplicabilidad del protocolo y la propuesta que regulará la actividad de repoblamiento, se vio en la necesidad de explicitar la protección del medioambiente en donde se realizará el redoblamiento. Esto, especialmente, cuando con el objetivo de maximizar el éxito del establecimiento de los individuos repoblados se hagan modificaciones permanentes en el ambiente o en la comunidad que vayan más allá de lo que se puede esperar como producto de la variabilidad natural, normalmente prevista para ese ambiente en particular. La versión final del protocolo, tendiente a reducir riesgos de daño ambiental en la liberación y establecimiento de organismos bentónicos, se entrega a continuación (ver Anexo III para una compilación de todos los protocolos con algunas observaciones y/o definiciones técnicas):

PROTOCOLO IV.
CONSIDERACIONES PARA REDUCIR RIESGOS DE DAÑO AMBIENTAL EN LA LIBERACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE ORGANISMOS BENTÓNICOS

Liberación y Establecimiento de Adultos, Juveniles y Larvas.

4.1. El proceso de liberación y establecimiento debe respetar en todas sus etapas el bienestar de los organismos.

4.2. El proceso de liberación deberá contar, obligatoriamente, con una línea base del sector a repoblar que considere los elementos del sistema que pudieran verse modificados por la acción de repoblamiento.

4.3. Con el objeto de facilitar la evaluación posterior de la acción de repoblamiento, la línea base deberá incluir un registro de los principales factores ambientales, relevantes para la especie, que deberán ser tomados en el momento de la liberación. Estos debieran incluir parámetros físicos, químicos y biológicos.

4.4. En el caso que en la liberación o en el establecimiento se tenga contemplado realizar manipulaciones del ambiente para facilitar la acción de repoblamiento, su efecto sobre el ambiente deberá estar debidamente evaluado (preferentemente mediante estudios de terreno). Esto hace referencia a:

(a) modificación del substrato
(b) control de depredadores
(c) control de especies competidoras
(d) incorporación de jaulas, cercos, u otras instalaciones.

4.5. La liberación deberá contemplar un programa de seguimiento de la comunidad intervenida, con el objeto de evaluar en el mediano y largo plazo el efecto de la acción sobre la población de interés y sobre el ambiente, señalando los indicadores correspondientes. Esto debiera contemplar:

(a) abundancia de la especie repoblada
(b) abundancia de sus especies presa (si corresponde), depredadores y competidores
(c) los factores ambientales considerados en el punto 4.3

1.5. Propuesta para la Regulación de las Actividades de Repoblamiento.

De lo generado durante la ejecución del estudio, en las conversaciones con la autoridad competente y, principalmente, inspirado en las discusiones y conclusiones que se llegaron con expertos durante la realización del *workshop* internacional, "*INTERNATIONAL WORKSHOP RESTORATION OF BENTHIC INVERTEBRATE POPULATIONS: Genetics, Diseases & Ecology*", hemos desarrollado la siguiente propuesta con el objeto de regular las actividades de repoblamiento.

Definición de "repoblación":

De acuerdo a la ley, *repoblación* está definida como "la acción que tiene por objeto incrementar el tamaño o la distribución geográfica de la población de una especie hidrobiológica, por medios artificiales". En nuestra opinión el "incrementar ... la distribución geográfica" debe ser borrado de esta definición. El llevar a una especie a un sitio fuera de su distribución geográfica debe ser considerado como una "introducción de especie exótica". Por lo tanto, "repoblación" o "repoblamiento" debiera quedar sólo como "la acción que tiene por objeto incrementar el tamaño de la población de una especie hidrobiológica en su medio natural, por medios artificiales".

PROCESO PARA LA AUTORIZACIÓN DE UNA ACCIÓN DE REPOBLAMIENTO

El proceso se ha diseñado en dos etapas, una ETAPA ADMINISTRATIVA y una ETAPA OPERATIVA, cada una conformada por dos pasos. Esto tiene la finalidad que la Autoridad pueda opinar respecto a lo que el proponente está comprometiendo hacer para cumplir los protocolos, antes de que éste inicie su trabajo práctico. Esto da la oportunidad de ponerse de acuerdo en forma previa respecto a los antecedentes a entregar y/o estudios a realizar en cada caso particular. Ello es necesario, pues por la diversidad de especies y acciones

posibles, y la general falta de conocimientos o experiencias previas a tales acciones, el análisis y la autorización deberá ser realizado caso a caso. De este modo, los protocolos delinean los criterios generales de los aspectos a considerar en una acción de repoblamiento, ya que han sido concebidos como *indicativos* y nunca debieran ser entendidos como *normativos*.

A. ETAPA ADMINISTRATIVA.

A.1. Presentación a la Autoridad de la propuesta, con su debida fundamentación.

Cada propuesta deberá tener como mínimo los siguientes antecedentes:

- Identificación del proponente
- Identificación del problema a resolver
- Identificar los objetivos de la acción
- Identificación de la especie objetivo
- Identificación del lugar a repoblar
- Identificación de la o las poblaciones donantes
- Número de individuos a liberar
- Densidad y estrategia de siembra
- Período en que se realizará la repoblación
- Actividades de repoblamiento propuestas
- Línea base del lugar a repoblar
- Línea base de la población donante
- Propuesta de indicadores para evaluar impactos de la acción (en la especie objetivo y en el ambiente)
- En el marco de los protocolos respectivos, se requerirán consideraciones teóricas respecto a los riesgos de:
  (*i*) diseminación de enfermedades, plagas o epibiontes,
  (*ii*) de afectar el patrimonio genético,

(*iii*) de afectar el ambiente en el proceso de traslado y

iv) de afectar el ambiente en la liberación y establecimiento de la especie a repoblar

- Plan de monitoreo

Si para una o más de las consideraciones respecto a los riesgos de la acción de repoblamiento no hubiere suficientes antecedentes técnicos disponibles (en la literatura científica, en informes técnicos, etc.) y, por tanto, no se pudiera dar en forma teórica una respuesta satisfactoria a lo que demandan los protocolos, se requerirá que el proponente diseñe el trabajo necesario para obtenerlos. En ese caso, la propuesta deberá estar acompañada con los términos técnicos de referencia (TTR) del trabajo que se realizará para obtener los antecedentes que faltan.

La información que se aporte sobre la acción propuesta debe ser conducente a:

Respecto a enfermedades, plagas y epibiontes: minimizar el riesgo de diseminar enfermedades, plagas o epibiontes a sitios declarados libres en el marco de un programa sanitario de vigilancia ya existente o, que en base al propio estudio realizado en el marco del repoblamiento propuesto, califiquen como libres.

Respecto al patrimonio genético: minimizar el riesgo de afectar el patrimonio genético, en cuanto a modificar la variabilidad genética de la población de origen y en el lugar a repoblar.

Respecto al ambiente: minimizar el riesgo de afectar en forma negativa el medio ambiente, tanto en el lugar del cual provienen los individuos a repoblar, durante su traslado, como en su liberación y establecimiento en el sitio receptor.

A.2. Evaluación por parte de la Autoridad de la presentación, aprobando, rechazando o solicitando mayor información o estudios adicionales.

La Autoridad procederá al rechazo inmediato cuando existan las siguientes razones:

i) Se proponga el traslado de una especie fuera de su rango de distribución geográfica (se entiende como introducción de especie exótica).
ii) Se detecte en el sitio donante una enfermedad de alto riesgo, incorporada en Lista 1.
iii) Se proponga el traslado a un sitio declarado libre de enfermedades de alto riesgo (Lista 2), desde uno que no tenga esa condición.
iv) Los antecedentes entregados señalen el riesgo de impacto negativo sobre el lugar receptor o la población donante.
v) Exista riesgo cierto de dispersión de marea roja u otro organismo considerado como plaga.

En la revisión la autoridad evaluará:

- justificación y fundamentos de la propuesta
- nivel de información existente y entregada para reducir riesgos de la actividad propuesta, utilizando para ello los protocolos
- acciones propuestas para mejorar la información sobre eventuales riesgos y como reducirlos.
- las necesidades de documentación adicional, tales como certificado sanitario, guías de libre tránsito etc., considerando la magnitud y distancia del traslado propuesto.

En esta etapa sería deseable la consulta a un experto independiente. La especialidad del experto dependerá en cada caso del tema que pudiera aparecer

como más problemático de la acción propuesta. Se sugiere constituir una lista de expertos.

B. ETAPA OPERATIVA

B.1. Informe Presentado por el Proponente con lo Solicitado por la Autoridad

El proponente recopila la información que comprometió en sus TTR y la solicitada por la autoridad (en caso que así hubiera ocurrido), entregando un informe a la Autoridad. El informe deberá contener los resultados de la aplicación de los protocolos para los temas de enfermedades y genética, además, de la propuesta definitiva de las actividades de repoblamiento a realizar. Esto último debiera incluir la metodología a emplear, con especial consideración de los protocolos de traslado y liberación. También se deberá explicar el diseño de muestreo e indicadores para un seguimiento futuro del efecto de la acción de repoblamiento propuesto.

B.2. Aprobación o Rechazo Definitivo de la Propuesta.

La Autoridad aprueba o rechaza definitivamente la actividad de repoblamiento propuesto. En el caso de aprobación, la Autoridad establecerá los requerimientos mínimos para el programa de seguimiento.

SECCIÓN II. APLICACIÓN PROTOCOLOS

Esta sección detalla las actividades realizadas para dar cumplimiento al quinto objetivo del estudio:

Objetivo 5. Aplicar los protocolos desarrollados en los objetivos anteriores para efectuar el repoblamiento del recurso macha en el sector "Playa Las Machas" en Arica.

Esto corresponde la ejecución de la experiencia piloto de repoblamiento de machas, en "Playa Las Machas" de Arica, siguiendo la segunda versión de los protocolos como resultado de lo realizado en los objetivos 1 al 4. El desarrollo de esta etapa incluyó definir la estrategia a seguir en el repoblamiento, las potenciales poblaciones donantes, la toma de muestra de material vivo para el estudio histopatológico, electroforético y morfométrico, experiencias en terreno tendientes a resolver los problemas de traslado y liberación, además de experiencias en laboratorio dirigidas a la obtención de larvas competentes de macha.

2.1. Estrategia de Repoblamiento.

La estrategia seguida en la experiencia piloto de repoblamiento de machas en Playa Las Machas de Arica fue la adaptación al nuevo conocimiento adquirido, siendo el resultado de la experiencia ganada a través del desarrollo del estudio. Esto incluye tanto la revisión bibliográfica como los criterios y lineamientos que resultaron del *workshop* y de la discusión científica. En ese contexto, es necesario enfatizar que lo finalmente realizado se ajusta en cuanto a objetivo, pero no necesariamente en cuanto al detalle de actividades, a lo que en forma preliminar se había diseñado en la propuesta técnica del proyecto.

- **Repoblamiento con adultos.**

Originalmente, en la puesta a prueba de los protocolos en la experiencia piloto de repoblamiento se tenía considerado realizar un traslado de juveniles y adultos. De la experiencia obtenida en la recuperación de las poblaciones de ostras (Mann, 2000) y almejas (Arnold, 2001), de lo discutido en el *worksho*p y de lo acotado del proyecto en el tiempo, se concluyó que lo que se debería buscar en la iniciación de un repoblamiento de macha era el establecer una pequeña población que sea capaz de reproducirse. En ese contexto, los juveniles no harían un aporte sino hasta que lograsen madurar. Pero, mientras tanto, sufrirán mortalidad y dispersión de modo que su contribución futura podría ser mínima. Por ello, y en términos de fecundidad, resultó aconsejable trasladar sólo adultos. Y en un momento en que estuvieran pronto a desovar, acortando al máximo el tiempo en que pudiera actuar la mortalidad y la dispersión. Esta condición se dio a fines de enero, realizando en ese momento el traslado. A su vez, la liberación se había programado realizarla en varios parches, generando réplicas. Esto también fue modificado, puesto que para asegurar el éxito de la reproducción era necesario generar una concentración alta de individuos (Levitan *et al*., 1991). El separar a los individuos en varios parches habría atentado contra ello. El diseño de los parches buscaba generar réplicas que permitieran evaluar el éxito del establecimiento de los individuos como tales. Pero, más que el establecimiento de los individuos, resultaba importante su reproducción, debiendo evaluar el éxito del repoblamiento no a través de la supervivencia de los individuos trasladados, sino a través de la aparición de juveniles, o macha arroz, posterior al repoblamiento.

- **Repoblamiento con larvas.**

Una segunda estrategia de repoblamiento encontrada en la literatura, con consideraciones técnicas y biológicas diferentes, es la recuperación de los bancos mediante repoblamiento con larvas. Como esta técnica puede llegar a ser relevante en las acciones de repoblamiento en un futuro próximo, se consideró

necesario evaluar la aplicación de los protocolos para este tipo de acción. De este modo, se diseñó una experiencia piloto de repoblamiento con larvas de machas en Playa Las Machas de Arica. El objetivo principal de esta estrategia busca disminuir la incertidumbre del reclutamiento en la población a restablecer. Básicamente, y una vez en su nuevo ambiente, los adultos deben desovar, debe producirse la fecundación, el desarrollo larval y, finalmente, el asentamiento/ reclutamiento. Como cada uno de estos procesos estarán sometidos a condiciones ambientales no manejables, el resultado es bastante incierto, más aún en poblaciones disminuidas (antes o durante el repoblamiento). En consideración a esto, es que se busca reducir la incertidumbre generando el desove, fecundación y desarrollo larval en el laboratorio, con la consecuente *inyección de larvas competentes* al ambiente (Arnold, 2001). Por supuesto, el éxito de este procedimiento se maximiza con el suministro masivo de larvas (cientos de millones), aunque no necesariamente de larvas competentes. Sin embargo, esto requiere el dominio de la técnica de producción masiva en ambiente controlado – *hatchery* –. Aunque con una mayor incertidumbre asociada, este procedimiento resulta más ventajoso que la liberación de juveniles, en donde la obtención masiva de semillas es mucho más costosa y restringida. La liberación de larvas y, en nuestro caso, de larvas competentes, puede llegar a ser un procedimiento habitual, por ejemplo, como estrategia complementaria por sus bajos costos. En el presente proyecto, la producción masiva de larvas competentes no estaba asegurada (no así de larvas pre-competentes). De este modo, y aunque se perseguía el éxito del repoblamiento, se hacía necesario realizar el ejercicio para medir la operatividad de los protocolos en la eventualidad que tales estrategias llegasen a masificarse.

2.2. Metodología.

2.2.1. Potenciales Poblaciones Donantes.

Con el objeto de establecer la o las poblaciones de machas que efectivamente podrían actuar como poblaciones donantes en la experiencia piloto

de repoblamiento, se procedió a un reconocimiento de terreno el que se concentró en la I y II Regiones. Este se realizó entre el 4 y 12 de Agosto del 2002. Adicionalmente, también se exploraron otras alternativas a lo largo de la costa Chilena. A mediados del verano del 2003 (entre el 22 de Enero y 3 de Febrero) se repitió parte del recorrido, con el objeto de tener la visión estival del sistema y comprobar las observaciones de los lugareños relativo a la presencia de machas. Los sectores de costa de la I Región que fueron visitados corresponden, de norte a sur, a Playa Las Machas de Arica y su continuación en territorio peruano, Caleta Vítor, Caleta Quebrada Camarones, Sector de Pisagua, Playa Brava de Iquique, Playa El Aguila, Playa Chomache, Playa Ike-Ike o Peruana y Playa Chipana. Los sectores de costa de la II Región fueron Playa Hornitos y Playa Mejillones. En la IV Región fueron considerados dos sectores, Caleta San Pedro de Bahía Coquimbo y Playa Larga de Tongoy, en Bahía Tongoy. Estos fueron visitados en varias oportunidades entre Marzo de 2002 y Enero de 2003. Finalmente, se incluyeron otras dos localidades de la costa centro-sur de Chile, Nehuentué (XI Región) y Cau-Cau (X Región). Ambas localidades presentan bancos de machas y se muestrearon con el objeto de lograr una caracterización genética de las poblaciones de machas en toda su distribución a lo largo de la costa de Chile. Con el esquema de muestreo se cubrieron los dos extremos [Playa Hornitos (inicialmente Arica) y Chiloé], además de poblaciones intermedias, ambas localidades de la IV Región y la de Nehuentué. La muestras del centro-sur (Cau-Cau y Nehuentué) fueron obtenidas a través de pescadores y enviadas a nuestro laboratorio en estado fresco. Estas muestras fueron tomadas durante los meses de Diciembre de 2002 y Enero de 2003. La caracterización genética lograda mediante este estudio para la macha demostró que sólo hay diferencias mínimas entre poblaciones a lo largo de Chile. Para los efectos del repoblamiento de la macha, ello significa que, desde el punto de vista genético, cualquiera de las poblaciones a lo largo de la costa de Chile sirve como donante para cualquier otro sitio. Es decir, para la selección del lugar donante se pueden privilegiar otros aspectos, sin importar mayormente sus similitudes/diferencias genéticas (ver Comentarios a la aplicación del protocolo en el punto 2.3.3.). Una descripción de

los sectores, el análisis de esa información y los criterios que sustentaron la selección de la población donante de machas para la experiencia piloto de repoblamiento son entregados en el punto 2.3.1. En este punto, y en la aplicación de los protocolos, se eligió la mejor opción disponible, la que no necesariamente correspondió a la opción ideal.

Este reconocimiento también permitió definir el origen del *stock* parental de machas para la experiencia piloto de repoblamiento con larvas. El principal obstáculo para la producción de gametos viables fue la obtención de reproductores que presentasen una madurez adecuada de sus gónadas. Dada la proximidad de los bancos de machas de Bahía Coquimbo y Bahía Tongoy, y al acceso expedito a un número grande de animales para la inducción al desove, estos bancos fueron las únicas fuentes de reproductores en la obtención de larvas competentes para la experiencia piloto de repoblamiento con larvas (ver punto 2.2.4. en *Experiencia piloto de traslado: Repoblamiento de machas con larvas*).

2.2.2. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo de traslado: tema enfermedades.

La aplicación del protocolo tendiente a minimizar los riesgos de propagar plagas, enfermedades y parásitos exigió el siguiente procedimiento (ver segunda versión del protocolo). Desde la población donante (ver criterios en punto 2.3.1. de resultados) fueron muestreadas 150 machas con el fin de analizar histológicamente la probable presencia de parásitos. Previo al estudio, y con el objeto de optimizar la calidad del corte histológico, las machas fueron desarenadas durante 48 horas en agua de mar corriente, en un estanque de 200 litros ubicado dentro del hatchery de la Universidad Católica del Norte.

Cada ejemplar fue abierto, desprendiéndolo de las valvas y ubicando todos los tejidos blandos dentro de una caja de inclusión histológica. Estos tejidos fueron fijados en líquido de Davidson´s durante 24 h (Shaw & Battle, 1957),

cuidando que el volumen de fijador excediera en 10 veces el volumen de las muestras. Posteriormente, fueron transferidos a etanol al 70%, deshidratándolos en etanoles de gradación creciente, aclarados en xilol y embebidos en Paraplast, todo esto según técnica corriente. Se realizaron cortes de 6 µm de espesor de cada muestra, tiñendo con hematoxilina de Harris y eosina amarillenta alcohólica (H-E). Cada corte fue analizado al microscopio de luz en busca de parásitos, tanto unicelulares como metazoos. Las epizootias y epibiontes a pesquisar como los procedimientos de búsqueda utilizados se encuentran detallados en el Anexo I, títulos I.1.1., I.1.2., I.2.1. y I.2.2.

El resultado de este estudio entregó los antecedentes necesarios para decidir, en términos de las enfermedades, sobre la factibilidad de la experiencia piloto de repoblamiento, tanto para la experiencia con adultos como para con larvas.

2.2.3. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo de traslado: tema genética.

- *Estudio de electroforesis*

La aplicación del protocolo tendiente a minimizar los riesgos relativo a aspectos genéticos (ver segunda versión protocolo) sugirió el siguiente procedimiento. Identificadas las potenciales poblaciones donantes a lo largo de la costa chilena (ver punto 2.3.1 de resultados), se muestrearon entre 50 y 60 machas por población con el fin de analizar su grado de variabilidad y grado de afinidad con la población de machas de Arica. Esto fue realizado mediante electroforesis en almidón en frío y que corresponde a una de las técnicas sugeridas para este tipo de estudio y que se mencionan en el Anexo I, título I.2.1. Las poblaciones consideradas para este estudio fueron (ver Figura 1 para su ubicación a lo largo de la costa de Chile): (*i*) Playa Hornitos, localizada al norte de Antofagasta, y corresponde a la población de machas más cercana a la ciudad de

Arica desde donde se pudo obtener muestras biológicas para este estudio; (*ii*) Caleta San Pedro, localizada en el sector norte de la Bahía Coquimbo; (*iii*) Bahía Tongoy, localizada en el sector norte de la Playa Larga de Tongoy; (*iv*) Nehuentué, localizada en la costa frente a la ciudad de Temuco; y (*v*) Cau-Cau, ubicada en la costa expuesta de la Isla Grande de Chiloé. Sin embargo, e incluyendo la última visita realizada en Marzo de 2003, no ha sido posible encontrar machas en la zona de Arica. En consecuencia, y para fines comparativos, se asume que la población de machas presente en Hornitos posee una identidad genética de mayor similitud con la población colapsada de Arica.

Previo al estudio, se realizaron pruebas de la actividad enzimática de diferentes tejidos con machas provenientes del sector Caleta San Pedro, Coquimbo. Las corridas de prueba fueron realizadas tanto con tejidos de machas vivas como de machas congeladas, con el objeto de detectar eventuales diferencias en la actividad enzimática. Se utilizaron 10 ejemplares de *Mesodesma donacium* para el análisis electroforético probando el mayor número de enzimas posible. Esto fue realizado en dos tejidos que, en las especies de moluscos en que se han probado, son los que muestran la mejor resolución: músculo y hepatopáncreas.

El hepatopáncreas arrojó la mejor resolución, utilizando los tejidos de este órgano para el estudio genético que incluyó a todas las poblaciones. Además, no hubo diferencias en la actividad enzimática entre muestras frescas y muestras congeladas. Esto facilitó el procesamiento de los tejidos y la obtención de muestras a gran distancia.

A cada individuo se le extrajo una cantidad aproximada de 0,5 gr de hepatopáncreas, muestra que fue puesta dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 ml agregándole una solución de Sacarosa 0,5 M como buffer de extracción. Los tubos fueron individualizados y congelados para su posterior uso.

Previo a la realización de la corrida electroforética, los tubos con su muestra fueron descongelados a temperatura ambiente y centrifugados durante 3 minutos en una microcentrífuga a 5.000 rpm. Dentro de este "caldo enzimático" se puso un trozo de papel filtro (15 x 4 mm), los que una vez embebidos en este caldo fueron ubicados en el gel. Se incluyó como marcadores de corrida papeles filtro embebidos en una solución de amido-black. Las soluciones tampón o buffer de corrida de electroforesis para las machas fueron: Tris - Citrato pH 7,0 continuo, Tris – Citrato discontinuo (pH 8,4 y 7,0) y Tris – Citrato EDTA pH 7,0 continuo. Para las corridas se utilizó gel horizontal de almidón (Connaught) al 10% o 13%, en recipientes de 18 x 21 cm, utilizando como fuente de energía una fuente de poder marca Hoefer Scientific Instruments.

Terminado el tiempo de corrida, el gel fue cortado en 5 - 6 capas de un grosor aproximado de 1,5 – 2,0 mm. Cada capa fue utilizada para revelar mediante tinción una enzima específica. Todas las enzimas fueron reveladas a 37ºC en una estufa marca Heraeus Instrument para que ocurriera la reacción. La a excepción fue la Superóxido dismutasa (SOD) la que reveló utilizando una fuente lumínica. En general, los procedimientos y técnicas de tinción se realizaron según pautas descritas por Aebersold *et al*., 1987. La reacción de las enzimas se detuvo con una solución de ácido acético al 5% o de ácido acético: metanol: agua (1: 1: 2), dependiendo si el revelado fue en baño líquido o en sólido de agar. Los geles se mantuvieron en esta solución entre 2 – 4 días, para luego llevarlos a una solución de glicerina 7% donde se mantuvieron por otros 2 días. Finalmente, los geles fueron montados entre papel celofán sobre un vidrio para su diafanizado. Una vez secos, los geles fueron retirados del vidrio y archivados.

Se estudiaron los siguientes sistemas enzimático: Malato deshidrogenasa (MDH), Fosfogunato deshidrogenasa (PGD), Leucin amino peptidasa (LAP), Aspartato amino transferasa (AAT), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Superoxido dismutasa (SOD), Esterasa (EST), Enzima málica (ME), Manosa-6-fosfato isomerasa (MPI), Fosfoglucomutasa (PGM), Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

(G3PDH), Catalasa (CAT), Peptidasa Glicina Leucina (Pep Gly Leu), Peptidasa Alanina Metionina (Pep Ala Met), Peptidasa Prolina - Leucina (Pep LT), Peptidasa Leucina-Glicina-Glicina (Pep LGG), Peptidasa Leucina - Alanina (Pep Leu Ala), Peptidasa Leucina-Leucina-Leucina (Pep Leu Leu Leu). Las enzimas IDH, PGD y PGM mostraron actividad tanto en tejido digestivo como en el músculo, revelando con mayor resolución en hepatopáncreas. Las enzimas EST, SOD, G3PDH, MPI, ME, CAT y Peptidasas mostraron actividad sólo en tejido digestivo, mientras que la MDH, LAP y AAT no presentaron actividad enzimática

La designación de cada enzima fue con letras mayúsculas, mientras que en los loci se utilizó mayúsculas, minúsculas y cursiva. Los alelos fueron nombrados de acuerdo a su movilidad electroforética relativa dentro del gel. El alelo más común se designó arbitrariamente con el valor 100, mientras los demás alelos se nombraron acorde la movilidad relativa que presentaron con respecto a este. Se consideró como loci polimórfico si la frecuencia del alelo más común fue igual o menor a 0,99.

A partir de los datos electroforéticos se estimó la variabilidad genética de las poblaciones, calculando las frecuencias genotípicas y alélicas de los locus para cada una de ellas de acuerdo a Ayala & Kiger (1984).

Se verificó si las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy – Weinberg, utilizando las desviaciones genotípicas respecto de las esperadas mediante la prueba de X^2 para la bondad de ajuste (Sokal & Rholf, 1981). Además, fue estimada la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) para cada población (Frankham *et al*., 2002), la similitud genética de las poblaciones mediante el índice de Identidad genética (Nei, 1972) y la distancia genética standard (D) entre ellas (Nei, 1972).

• *Estudio morfométrico*

Paralelo al estudio genético, se realizó un estudio morfométrico en las mismas poblaciones donde se realizó el estudio de electroforesis. El número de individuos medidos por población fue: Playa Hornitos, *n* = 298; Caleta San Pedro, *n* = 176; Bahía Tongoy, *n* = 200; Nehuentué, *n* = 101; Cau-Cau, *n* = 232, muestra que incluyó el espectro de tallas más amplio al que se pudo acceder por población. Este análisis, que no lo exige el protocolo, es complementario al anterior debido que cuantifica una de las expresiones fenotípicas más relevante en el momento de diferenciar animales (y poblaciones), esto es, su tamaño y volumen. Las medidas consideradas en este estudio fueron: largo máximo, ancho, alto y longitud umbonal, esta última definida como la medida que va desde el punto medio del umbo al extremo distal. Las relaciones funcionales entre estas medidas y/o entre proporciones de ellas permitieron definir la morfología de cada población y, en consecuencia, diferenciarlas en caso de presentar diferencias. Estas relaciones y procedimientos rigurosos para evaluar expresiones fenotípicas de las poblaciones se encuentran en el Anexo I, título I.2.2.

El resultado de este estudio entregó los antecedentes necesarios para la aplicación del protocolo en la experiencia piloto de repoblamiento, tanto para la experiencia con adultos como para con larvas.

2.2.4. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo de traslado: tema transporte.

La aplicación del protocolo para el transporte de organismos bentónicos con fines de transposición exige procedimientos administrativos y de higiene que son relevante al transporte propiamente tal y serán abordados en el punto *experiencia piloto de traslado*. Sin embargo, el éxito del repoblamiento dependerá, en gran medida, de cómo los animales soportaron el estrés fisiológico al que estuvieron sometidos durante el transporte. Esto, como una consecuencia directa de las

condiciones en el traslado y del tiempo transcurrido desde el embarque hasta la liberación. En este sentido, y de acuerdo a la estrategia de repoblamiento (con adultos), se diseñó una serie de experimentos que apuntaron a simular condiciones de traslado, con el objeto de adelantarse a las posibles contingencias a encontrar en el camino. La respuesta a medir fue la supervivencia de las machas, estimada mediante la capacidad de entierro, luego de estar sometidas a diferentes tipos de estrés.

- *Experimento T.1. Supervivencia en dos tipos de empaques*

Se probaron dos tipos de empaque para el traslado de las machas: cajas térmicas con espuma de alta densidad de 90,0 x 25,5 x 33,0 cm, y mallas usadas por los pescadores artesanales para la extracción de las machas. Las machas utilizadas en este experimento fueron extraídas del banco localizado frente a la Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo, y trasladada a la Universidad Católica del Norte. Todas las machas fueron individuos adultos, en el rango de talla de 60 – 75 mm. Los animales se mantuvieron por 4 horas bajo sombra. Al cabo de ese tiempo fueron elegidas al azar 30 machas de cada uno de los empaques y colocarlas en bandejas con arena y agua de mar circulante. Se tomó el tiempo que demoró cada macha en enterrarse en la arena, siendo esta capacidad de enterrarse el indicador de supervivencia y viabilidad.

- *Experimento T.2. Supervivencia en empaques herméticos de plumavit*

Las machas utilizadas en este experimento fueron extraídas del banco localizado frente a la Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo, y trasladada a la Universidad Católica del Norte. Aquí, las machas fueron medidas, rehumedecidas e, inmediatamente, montado el experimento. El empaque consistió en cajas térmicas de plumavit de 90,0 x 25,5 x 33,0 cm. Las machas fueron dispuestas en tres capas, cada una de un individuo de grosor, separadas por una cubierta de espuma de alta densidad de 3 mm de espesor. Una tercera capa de espuma cubrió la capa superior de machas. Previamente, las espumas

fueron humedecidas con agua de mar filtrada. El experimento incluyó dos tratamientos, machas adultas (>60 mm de longitud) y juveniles (<40 mm de longitud). Las machas fueron dispuestas una al lado de la otra y cubrieron toda la superficie horizontal interior de la caja. Se armaron 3 empaques por tamaño de machas (3 réplicas) las que fueron puestas dentro del hatchery de la Universidad Católica del Norte, en un ambiente bajo sombra pero sin control de la temperatura. Al cabo de 1, 3, 6, 12, 18, 24 y 36 horas se extrajeron al azar 10 machas adultas y 10 machas juveniles, eligiendo al azar las cantidades de 3 - 3 - 4 desde los empaques. Las machas fueron colocadas en bandejas con agua de mar circulando y con un fondo cubierto con 15 cm de arena proveniente del mismo sector de donde se extrajeron las machas. La capacidad de enterrarse fue el indicador de supervivencia y viabilidad.

- *Experimento T.3. Supervivencia en empaques herméticos de plumavit: efecto de la talla, hacinamiento y temperatura.*

Las machas utilizadas en este experimento también provienen del banco localizado frente a la Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo. Una vez en el laboratorio, las machas fueron medidas y sorteadas en dos rangos de tallas: 30 - 49 mm (machas chicas) y 50 - 69 mm (machas grandes). Inmediatamente después, fueron empacadas en cajas de plumavit de 40,0 x 15,0 x 15,0 cm. El experimento consistió en 4 tratamientos: en el tratamiento 1 se colocaron machas grandes que cubrieron la totalidad del volumen de la caja (70 machas); en el tratamiento 2 se dispuso la mitad de la cantidad anterior (35 machas). De igual modo se prosiguió con las machas chicas, pero utilizando una cantidad de 100 machas para cubrir el volumen total de la caja, tratamiento 3, utilizando una cantidad de 50 machas para el tratamiento 4. Entre cada capa de machas se puso una capa de esponja de 5 mm de espesor, humedecida con agua de mar. Una vez terminado el empaque, las cajas fueron dejadas bajo sombra sin control externo de temperatura.

En el diseño experimental fue considerado un segundo factor, siendo este la temperatura. De este modo, el experimento consistió en dos *set* con los cuatro tratamientos anteriores, adicionando en los tratamientos de uno de ellos una capa de hielo en el fondo de las cajas. Esto hizo disminuir en 5°C la temperatura al interior de estas. En promedio, en los empaques sin hielo la temperatura fue de 19°C, mientras que en las que se le adicionó hielo esta fue de 14°C. El hielo fue puesto en forma de cubos sueltos. Para cada combinación - tamaño, densidad y temperatura - se realizaron 3 replicas. Los empaques fueron sellados y dejados por un período de 48 h, correspondiendo a este el tiempo de duración del experimento.

Finalizado el tiempo de experimentación, los empaques fueron abiertos y las machas puestas en estanques con agua de mar circulante, cuyo fondo contenía una capa de sedimento proveniente del sector desde donde se extrajeron los animales. La respuesta a medir fue la capacidad de entierro de las machas luego de 110 minutos, tiempo determinado en base a observaciones previas. Se utilizó un ANDEVA de tres factores para determinar las eventuales diferencias.

- *Experimento T.4. Supervivencia en bandejas bajo condiciones extremas.*

Con el objeto de simular las condiciones en un transporte masivo de machas, esto es, en bandejas abiertas y transporte hermético pero no refrigerado (habitualmente utilizados para el traslado a grandes distancias de pescados y mariscos), se diseñó el siguiente experimento. En bandejas de 60,0 x 40,0 x 25,5 cm, aproximadamente, se dispuso 2 capas de 10 k de machas adultas (> 60 mm) cada una, separadas por una capa de espuma de 5 mm de espesor, humedecida con agua de mar. Sobre la última capa de machas también se ubicó una capa de espuma húmeda. Una bandeja fue puesta sobre una bolsa conteniendo en su interior hielo en cubos, apilando sobre esta una segunda bandeja. Esta unidad experimental fue repetida 2 veces. Todo este conjunto fue instalado dentro de una bodega metálica y cubierto por una lona. Al cabo de 24 y 48 h se extrajo de cada

capa por bandeja 100 machas, las que fueron dejadas en estanques con agua de mar corriendo y fondo con arena (ver experimento 2). La respuesta a medir fue la capacidad de entierro de las machas luego de 110 minutos, utilizando un ANDEVA de una vía para determinar las eventuales diferencias.

• *Experiencia piloto de traslado: Repoblamiento de machas con adultos.*

La experiencia piloto de repoblamiento con machas de la "Playa Las Machas" de Arica se realizó de la siguiente manera (ver criterios en el punto 2.3.1. de resultados). Los animales provinieron del banco del sector Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo, extrayéndolos desde una zona donde se encuentran sólo animales adultos y la mayoría por sobre la talla mínima de extracción (> 60 mm). La actividad fue realizada el día viernes 24 de enero, extrayendo las machas desde el área de manejo Peñuelas A. El desarrollo de la actividad requirió de la autorización por parte de la SUBPESCA, dado que los animales provenían, precisamente, de un área de manejo. Esto fue a través de una pesca de investigación, autorización Nº 129 con fecha 16 de Enero del 2003. Una vez autorizada la pesca de investigación, y para el traslado mismo, se requirió una guía de libre tránsito la que fue emitida por funcionarios del SERNAPESCA de Coquimbo.

El desembarque comenzó cerca de las 12:30 h y se extendió hasta las 14:30 h. En la actividad participaron las embarcaciones de las caletas Caleta Peñuelas (24 botes) y Caleta Coquimbo (6 botes). La extracción sólo fue realizada desde botes y mediante buceo dado que, en comparación con los orilleros, la macha sufre menos maltrato minimizando el porcentaje de machas quebradas durante la extracción. Las machas desembarcadas fueron mantenidas en la playa, cubriéndolas con esteras de totora y humedecidas regularmente con agua de mar.

Las machas fueron transportadas a Arica en un camión cerrado y acondicionado para el transporte de productos del mar. Las machas fueron colocadas en bandejas plásticas perforadas, de manera de evitar la acumulación de agua en el fondo de las mismas. Fueron utilizadas un total de 124 bandejas, lo que arrojó un peso total de 2.500 k de machas (aproximadamente 100.000 individuos). Una vez cargado el camión, las bandejas con las machas fueron cubiertas con 4 esteras de totora, de una dimensión de 3 x 4 m cada una, empapadas con agua de mar. Se eligió esta forma de traslado al ser el procedimiento que regularmente usan los comerciantes que transportan productos del mar, asegurando la supervivencia y calidad del producto.

En el interior del camión se colocaron sacos de hielo, de manera de mantener la temperatura lo más baja posible. Además, y para mantener a las machas con un nivel de humedad adecuado, el cargamento fue regularmente mojado con agua de mar que se transportó dentro del camión para tales efectos. Todo este procedimiento, desde la extracción de las machas, empaque y cargado del camión fue documentado en video, cuya versión para fines de divulgación se entrega en el CD del Anexo IV.

El camión con el cargamento de machas salió desde la Caleta Peñuelas a las 16:00 horas. La duración del traslado fue estimada en 27 h, sin embargo, y por distintos problemas mecánicos, el viaje se extendió por 34 h. El camión con las machas arribó a Arica a las 02:00 horas del día 26 de enero.

- *Experiencia piloto de traslado: Repoblamiento de machas con larvas.*

La experiencia piloto de repoblamiento con larvas de machas se realizó con reproductores provenientes de los bancos del sector Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo, y del sector Playa Larga, en la Bahía Tongoy.

Hubo un largo período en que los ejemplares de macha obtenidos desde los bancos naturales de los sectores Caleta San Pedro (Bahía de Coquimbo) y de Playa Larga de Tongoy (Bahía Tongoy) no presentaron gametos maduros y tampoco respondieron al acondicionamiento (ver Segundo Informe de Avance). Esta situación retrasó el desarrollo de la experiencia en sí. Una vez que se obtuvieron desde el medio natural individuos de machas con gametos maduros, el acondicionamiento de los reproductores, la obtención de gametos viables y de larvas resultó ser un procedimiento bastante manejable. Sin embargo, las obtención de larvas competentes y el eventual asentamiento y metamorfosis fue difícil de lograr. Básicamente, y luego de exitosos desoves, fecundación y obtención de "larvas D" en cantidades que oscilan entre los 20 y 40 millones, se produjeron mortandades masivas alrededor de los 9 días de cultivo que, a pesar de no asociarse a enfermedades, han hecho inviable el seguimiento de las larvas descartando completamente el *batch*.

El protocolo utilizado en el cultivo larval fue como sigue. Se dio inicio a cada cultivo con la verificación del estado de "larvas D". Seguidamente, se procedió a seleccionar las larvas con las que se seguiría el cultivo, tamizando el total de larvas en mallas de 90μ y 50μ. El primer tamizado (90μ) se usó para retener partículas de mayor tamaño que pudieran estar presente en el estanque de incubación, mientras que el tamiz de 50μ se ocupó para retener las larvas normales. Terminada la selección, las larvas fueron dejadas en las condiciones de cultivo definitivo, a una concentración inicial de 5 larvas·ml^{-1}.

El laboratorio y los procedimientos usados en el cultivo de larvas se documentan en el Anexo V.

Diariamente se procedió con el cambio total del agua del cultivo. Las condiciones generales del cultivo variaron de *batch* en *batch*, esto con el objeto de probar las diferentes alternativas apuntando a maximizar la producción masiva de

larvas competentes. Las fechas de los desoves y las condiciones de cultivo fueron:

21/10/2002: El cultivo se inició con un total de 8.000.000 larvas en estado D. La alimentación fue con la microalga *Isochrysis*, en concentraciones diarias entre 20.000 y 30.000 cel·ml^{-1}. Desde el cuarto día la alimentación consistió en una mezcla de *Isochrysis* y *Chaetoceros*, en igual concentración. El cultivo se realizó en 3 estanques cónicos de 500 l, a una temperatura de 20ºC y con aireación normal para un cultivo "tipo ostión". Luego de 10 días, las larvas alcanzaron el rango de talla de 140 - 180 μ, terminando el cultivo al observar mortalidad masiva.

06/11/2002: El cultivo se inició con un total de 3.000.000 larvas en estado D. La alimentación fue con la microalga *Isochrysis*, en concentraciones diarias entre 20.000 y 30.000 cel·ml^{-1}. Desde el séptimo día, la alimentación consistió en una mezcla de *Isochrysis* y *Chaetoceros*, en igual concentración. El cultivo se realizó en 2 estanques cónicos de 500 l, a una temperatura de 20ºC y con aireación normal para un cultivo "tipo ostión". Luego de 13 días, las larvas alcanzaron el rango de talla de 120 - 140 μ, terminando el cultivo al observar mortalidad masiva.

12/11/2002: El cultivo se inició con un total de 30.000.000 larvas en estado D. La alimentación fue con la microalga *Isochrysis*, en concentraciones diarias entre 20.000 y 30.000 cel·ml^{-1}. Desde el séptimo día, la alimentación consistió en una mezcla de *Isochrysis* y *Chaetoceros*, en igual concentración. El cultivo se realizó en 3 estanques de 5.000 l (con 4.500 l útiles), a una temperatura ambiental de 15-17ºC y con aireación 50% mayor a la normal para un cultivo "tipo ostión". Luego de 17 días, las larvas alcanzaron el rango de talla de 240 - 260 μ, terminando el cultivo al observar mortalidad masiva.

28/11/2002: El cultivo se inició con un total de 25.000.000 larvas en estado D. La alimentación fue con la microalga *Isochrysis*, en concentraciones diarias entre 20.000 y 30.000 cel·ml^{-1}. Desde el séptimo día, la alimentación consistió en una

mezcla de *Isochrysis* y *Chaetoceros*, en igual concentración. El cultivo se realizó en 1 estanque de 5.000 l (con 4.500 l útiles) y 8 estanques cónicos de 500 l, a una temperatura ambiental de 15-17ºC y con aireación 50% mayor a la normal para un cultivo "tipo ostión". Luego de 12 días, las larvas alcanzaron el rango de talla de 150 - 170 μ, terminando el cultivo al observar mortalidad masiva.

07/01/2003: El cultivo se inició con un total de 7.000.000 larvas en estado D. La alimentación fue con la microalga *Isochrysis*, en concentraciones diarias entre 30.000 y 35.000 cel·ml^{-1}. Desde el séptimo día, la alimentación consistió en una mezcla de *Isochrysis* y *Chaetoceros*, en igual concentración. El cultivo se realizó en 3 estanques cónicos de 500 l, a una temperatura ambiental de 15-17ºC y con aireación normal para un cultivo "tipo ostión". Estas larvas alcanzaron el rango de talla de 280 - 300 μ, presentando una buena supervivencia, y fueron con ellas con que se realizó la experiencia de repoblamiento en la Playa Las Machas de Arica.

20/01/2003: El cultivo se inició con un total de 10.000.000 larvas en estado D. La alimentación fue con la microalga *Isochrysis*, en concentraciones diarias entre 30.000 y 35.000 cel·ml^{-1}. Desde el séptimo día, la alimentación consistió en una mezcla de *Isochrysis* y *Chaetoceros*, en igual concentración. El cultivo se realizó en 4 estanques cónicos de 500 l, a una temperatura ambiental de 15-17ºC y con aireación normal para un cultivo "tipo ostión". Luego de 9 días, las larvas fueron eliminadas al observar mortalidad masiva.

Del desove realizado el día 7 de Enero del 2003, se logró llegar al día 21 con aproximadamente 1.000.000 de larvas competentes. Las larvas alcanzaron un rango de 280 a 300 μ, aunque algunas de ellas llegando a medir 340 μ. Estas fueron embarcadas vía aérea el día 28 de enero, arribando a Arica el mismo día alrededor de las 14:30 horas. Las larvas fueron confinadas en botellas de 2 l, con agua de mar filtrada y sin aireación. Estas fueron depositadas en empaques de plumavit, a temperatura ambiental. El envío exigió un certificado por parte de un profesional o institución competente que acreditara que el contenido del empaque

no era perjudicial para la salud humana ni tóxico para el medio ambiente (certificado exigido por el capitán de la aeronave comercial). En esta ocasión, el certificado fue emitido por la Unidad de Producción de la Universidad Católica del Norte.

En presencia del bajo número de larvas competentes logradas en el laboratorio, las experiencias de supervivencias de las larvas de machas a las condiciones de traslado fueron omitidas. De este modo, el procedimiento de traslado se realizó de acuerdo a la experiencia alcanzada por la unidad de producción de la Universidad Católica del Norte en el envío de larvas de ostras y ostiones.

2.2.5. Experiencia relativa a la aplicación del protocolo de traslado: tema liberación.

La aplicación del protocolo de liberación de organismos bentónicos, y su respectiva evaluación, obligó conocer el procedimiento de mayor eficiencia para la liberación, de acuerdo a las condiciones ambientales en las cuales el recurso a repoblar se desarrolla naturalmente. En este sentido, se diseñó una serie de experimentos que apuntaron a definir la estrategia de liberación, teniendo como respuesta la capacidad de entierro de las machas.

- *Experimento L.1. Respuesta al tamaño de sedimento en función de la talla.*

Las machas utilizadas en este experimento fueron extraídas del banco localizado frente a la Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo, y trasladadas a la Universidad Católica del Norte. Aquí, las machas fueron medidas, sorteadas por tallas y ubicadas en 9 acuarios previamente instalados dentro de un estanque de policarbonato de 1000 l. El estanque poseía agua de mar circulante y aireación constante. Tres acuarios fueron llenados hasta 1/3 de su capacidad con arena gruesa, otros tres con arena mediana y los restantes tres con arena fina. Las machas fueron separadas en tres rangos de tallas, denominando como machas

chicas a los animales <49 mm de largo, medianas entre 50 y 59 mm y grandes a las >60 mm. El diseño experimental consistió en colocar nueve machas de cada rango de talla en cada uno de los tres tipos de sedimentos. Todas las machas fueron puestas en la superficie de la arena en forma horizontal, contabilizando el tiempo que ellas tomaron en alcanzar el 100% de enterrado. Los registros se realizaron a intervalos de 5 minutos al comienzo de la experiencia, para luego aumentar a 10 minutos al fin del experimento. Se realizó un ANDEVA de dos vías para establecer las eventuales diferencias en el tiempo de enterrado, usando como factores ortogonales la talla de las machas y el tamaño del grano de sedimento.

- *Experimento L.2. Liberación dentro de parches de malla.*

Con el objeto de facilitar el enterrado y establecimiento de la población de machas durante la liberación, se diseñó un experimento consistente en la construcción de parches de malla dentro del cual se liberarían las machas. Los parches fueron instalados en el sector Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo.

Se confeccionaron parches de malla *raschell* de 35% de densidad, de 2,1 m de ancho y 10,0 m de largo, los que fueron fijados al fondo mediante estacas de fierro de 6 mm. Estas tuvieron la forma de grapa de 0,5 m de largo y fueron dispuestas por el perímetro del parche cada 1 m de distancia. Los parches de malla fueron probados, fijándolos al substrato durante la más baja marea y sobre una zona embancada de la playa a dos profundidades distintas: a 0,2 m y 0,6 m de profundidad, aproximadamente. Dentro de los parches se introdujeron machas adultas (> 60 mm) a una densidad promedio de 500 ind·m^{-2}. Durante la liberación se tomó nota del comportamiento de la malla y de la conducta mostrada por las machas. Las machas utilizadas en este experimento fueron extraídas del banco localizado en el mismo sector donde se instaló las mallas, permaneciendo bajo sombra antes de la liberación por un lapso de tiempo de 1 h, aproximadamente.

• *Experimento L.3. Liberación dentro de "candiles".*

Se les denomina "candiles" a los extensos pozones u hoyos que se forman en el piso de la playa, a profundidades someras (generalmente entre 0,5 - 1,5 m) y con profundidades que no van más allá de los 2 m. Estos "candiles" son "piscinas" naturales relativamente estables en el tiempo, al menos a corto plazo, y podrían ser utilizadas como lugar de liberación, evitando el arrastre de las machas por la acción de las olas y corrientes, facilitando, así, el entierro de ellas. De este modo, el objetivo del experimento fue verificar si los candiles pueden ser utilizados como lugar de liberación las machas, maximizando el éxito del repoblamiento. Para tal propósito se eligieron 2 "candiles" donde fueron liberados varios grupos de machas. Estas machas, todas adultas (> 60 mm) fueron obtenidas desde el sector Caleta San Pedro, en la Bahía de Coquimbo y mantenidas bajo sombra por cerca de 1 h. Las machas fueron puestas en bandejas, en cantidades aproximadas de 500 individuos. La liberación consistió en vaciar el contenido de las bandejas (*i*) por las orillas de los candiles y (*ii*) directamente al fondo de estos. Durante la liberación se tomó nota del comportamiento mostrado por las machas, especialmente su capacidad de entierro.

• *Experiencia piloto de liberación: Repoblamiento de machas con adultos.*

La liberación de los animales requirió preparar las condiciones para el evento. Para ello viajó a la ciudad de Arica un grupo de trabajo para organizar en terreno los aspectos administrativos y prácticos para el evento. En lo administrativo se tomó contacto con el Sernapesca de Arica, que debía supervisar la actividad. Igualmente, fue necesario obtener la autorización de ingreso a la playa por parte del Ejército de Chile (Regimiento Rancagua), puesto que la playa, por estar ubicada en zona fronteriza, esta bajo su tutela. A su vez, se tomó contacto con el presidente de la Organización de Pescadores Artesanales titular del área de manejo de machas. En lo práctico, se recorrió la playa y se eligió el lugar para proceder a la liberación. El lugar correspondió a una zona donde

habitualmente se cosechaba machas y que en la actualidad, a pesar de no encontrar machas, presenta condiciones para que este recurso esté presente: playa con alta dinámica, baja sedimentación y baja presencia de materia orgánica. El objetivo de la liberación fue generar un parche denso de animales, de modo que se asegurase una exitosa fecundación en el momento del desove. Por tanto se requirió buscar un lugar que asegurara que las machas liberadas no fueran dispersadas por las corrientes.

Las machas, todas adultas (> 60 mm), utilizadas para la experiencia fueron donadas por las organizaciones de pescadores artesanales de Peñuelas, Coquimbo y San Pedro. Con el fin de verificar su correcto traslado, entrega y liberación, viajaron por bus dos dirigentes de la Caleta Peñuelas a Arica. A su vez, el camión que realizó el traslado pertenece a un socio de la misma organización, al igual que los dos choferes que hicieron el traslado.

El arribo del camión con las machas a Arica fue en la madrugada, a las 02:00 horas del día 26 de enero. Las machas fueron mojadas con agua de mar fresca dentro del camión. Para ello se llevó el camión a la playa y con baldes se les tiró agua a las esteras que cubrían el cargamento. La liberación recién se pudo hacer una vez que existió luz del día, a las 07:00 horas de la mañana. A esa hora se llevó el camión a un lugar cercano de la playa y en camioneta 4x4 se trasladaron las bandejas en sucesivos viajes al lugar de liberación. La liberación fue un trabajo conjunto entre nuestro grupo de trabajo y los miembros de la A.G. de Arica, procediendo a vaciar las 124 bandejas en dos sectores, muy próximos entre si. Una documentación de la liberación de las machas en Arica se puede observar en el video que se entrega en el CD del Anexo IV.

En el momento de descargar las bandejas del camión, se sacaron muestras al azar de cada bandeja. Con esas muestras se procedió a hacer tres grupos de 100 individuos, que fueron utilizados para evaluar la mortalidad y

vitalidad de las machas. Para evaluar la vitalidad de las machas vivas, se midió la capacidad de entierro en baldes con fondo de arena y agua de mar.

Una vez liberadas las machas, se llevó por un lapso de una semana un registro de su comportamiento. En los días 1, 3, 5 y 7 después de la liberación se realizaron recorridos en el sector, verificando si habían machas varadas, devolviéndolas al agua en caso que fueran machas vivas. También se realizaron recorridos en el agua, verificando la existencia de machas sueltas. En los días 2, 4, 6 y 8 después de la liberación se realizó un muestreo con el fin de obtener una medida de densidad y vitalidad de las machas. El muestreo consistió en tres transectos, con tres estaciones cada uno. En cada estación se tomaron 3 *cores* de 0,04 m^2. Dependiendo del número de individuos colectado mediante los *cores*, se realizó una búsqueda de animales hasta completar un total de 100 individuos. Esta búsqueda consistió en un recorrido de la zona de liberación escarbando en el sedimento con manos y pies. Estos individuos fueron puestos en baldes con arena y agua de mar del lugar, verificando, como medida de su vitalidad, su velocidad de entierro promedio dentro de 120 min. Los individuos con los cuales se realizó el análisis de vitalidad en el primer día de recuperación fueron fijados para su posterior análisis histológico con el propósito de verificar la condición gonadal. El objetivo fue comprobar si habían logrado desovar.

A fines de Marzo del 2003 se visitó la zona de liberación con el objeto de medir el eventual éxito de la experiencia del repoblamiento. Se establecieron 18 estaciones a lo largo de la Playa Las Machas de Arica, desde el sector Chinchorro hasta aproximadamente 500 m de la frontera, los que incluyeron las zonas de liberación. En cada estación se muestreó el submareal somero (< 2 m de profundidad) y el intermareal bajo en búsqueda de adultos y juveniles. En el submareal la búsqueda se realizo visualmente (buceo a resuello) en una franja de 70 x 50 m, aproximadamente, además de escarbar con manos y pies el substrato. En el intermareal, se muestrearon n = 10 cores de 0,1 m^2, buscando también en la misma extensión de costa (70 m) la presencia de reclutas (macha “arroz”).

A mediados de Mayo se volvió a visitar el sector Playa Las Machas de Arica, repitiendo el mismo muestreo pero en un total de 25 estaciones. Es estas, también se incluyeron las zonas de liberación. En esta ocasión se visitó la porción de la playa que se encuentra en el territorio peruano, a la altura de Tacna. Aquí fueron establecidos un total de 14 estaciones a lo largo de 10 km de playa, aproximadamente, donde se procedió a muestrear el submareal somero y el intermareal bajo con el mismo procedimiento descrito más arriba.

• *Experiencia piloto de liberación: Repoblamiento de machas con larvas.*

Inmediatamente después del arribo de las larvas a Arica, y luego de su revisión bajo lupa para constatar su estado, se procedió con la liberación de ellas. Las larvas fueron liberadas en un sector de la Playa Las Machas, localizado frente a instalaciones de Carabineros. Este sector fue en el pasado, cuando aún existía el banco de machas, reconocido como un sector de crianza, caracterizado por la gran abundancia de machas juveniles. El contenido de las botellas fue vaciado en un balde con agua de mar del sector, homogeneizando suavemente la mezcla. Después de algunos minutos de reposo, y luego de observar que las larvas del fondo nadaban cortos trayectos, las larvas fueron liberadas vaciando el contenido del balde directamente al intermareal bajo.

La disposición de las estaciones establecidas para el monitoreo del submareal somero e intermareal bajo para el monitoreo de adultos y juveniles en los meses de Marzo y Mayo de 2003, incorporó la extensión de la playa donde se realizó la liberación de las larvas. De este modo, el eventual éxito de la liberación de larvas con fines de repoblamiento debería quedar registrado en esos muestreos.

2.3. Resultado de la aplicación de los protocolos en la Experiencia Piloto de Repoblamiento en Playa Las Machas de Arica

2.3.1. Potenciales Poblaciones Donantes.

Los resultados del recorrido de Agosto del 2002, las observaciones y sus conclusiones fueron las siguientes (ver Figura 1 para una referencia de la ubicación de los lugares visitados):

Playa Las Machas – Arica: Lugar objetivo del repoblamiento. Cabe hacer notar que todo el sector norte de esta playa es territorio limítrofe, controlado por el ejército. Por tanto se requiere de su autorización para ingresar. Solicitadas las autorizaciones, nos dieron todas las facilidades para acceder a la playa, acompañándonos una persona durante nuestros muestreos. Ello es necesario pues hay sectores minados y, según lo indicado, hay un sector en que bajó una quebrada, siendo posible que el agua haya arrastrado minas hacia la playa.

El muestreo consistió en un recorrido de la playa durante las horas de marea baja, desde 100 m al sur de la garita chilena que marca el límite, hasta el sector del cuartel. En tres sectores de esa extensión se realizaron muestreos. Para los muestreos se contó con la ayuda de un "machero", el cual realizó un recorrido, buscando machas en las "pampas" (se entiende como tales, sectores de banco de arena, planos y someros) que lograron localizarse. En forma paralela, se realizaron muestreos con *core*, filtrando la arena por una malla de un milímetro de abertura, desde el intermareal hasta 1 m de profundidad, buscando con ello reclutas de macha.

El resultado fue negativo: no se encontró ninguna macha adulta y, tampoco, ningún juvenil de macha. Llama la atención la morfología de esa playa, la cual se encuentra llena de hoyos, es muy correntosa, y las "pampas" que existen, son de extensión pequeña. Es actualmente una playa muy peligrosa para

trabajar. De acuerdo a antecedentes entregado por los pescadores, en el pasado tenía “pampas” extensas, aunque siempre tuvo hoyos y ha sido peligrosa por eso. De acuerdo a conversaciones con un pescador que vive y trabaja actualmente en la playa (sacando nape), no se han visto machas en cantidad en ningún sector, como para sacar en forma comercial. Sin embargo, habrían machas pero en muy baja abundancia. Según él, para fines de muestra o para ser utilizado como reproductores, se podría en una tarde de trabajo lograr juntar unos 50 ejemplares. De acuerdo a los antecedentes recogidos de los lugareños, en los meses de verano recién pasado, apareció un pequeño banco de machas en el sector de playa frente a la escuela de carabineros. Fue sin embargo explotado y volvió a desaparecer la macha en ese sector. Según el pescador, la macha se habría ido hacia una mayor profundidad. No obstante, en la evaluación realizada por el IFOP, tanto por tierra como por bote y buceo, no se encontró ninguna macha.

Continuación de Playa las Machas hacia Perú: Se fue a Tacna, tomando contacto allá con la oficina local del Ministerio de Pesquerías. Ellos de forma inmediata, y sin mayores inconvenientes, nos asignaron a una persona que nos acompañó a la playa. Recorrimos la playa desde el sector denominado “Cerro Cortado” cerca de su extremo norte, hacia el sur. Al igual que en la playa Las Machas, el mismo machero de Arica volvió a buscar machas, mientras nosotros con el core buscamos reclutas. Se realizaron búsquedas en un total de 3 sectores: Cerro Cortado, La Yerada, Los Palos. Se encontró sólo una macha pre-adulta (40 mm de longitud) en el sector de Cerro Cortado. En paralelo, se iban buscando conchas de machas varadas recientemente en la playa, lo cual tampoco tuvo éxito. Habían conchas, pero eran evidentemente más antiguas, sin periostraco.

Respecto al sector de playa de Tacna, llama la atención que a diferencia del sector chileno, es muy plana, tanto en la zona supralitoral, intermareal y submareal somero. Toda la playa es una gran “pampa”, muy plana, sin hoyos ni canalones.

Al finalizar el recorrido fuimos a conversar con pescadores de un poblado denominado San Pedro, que habitualmente trabajan en aquella playa. Ellos manifestaron que tampoco habían encontrado machas pero que, sin embargo, en los meses del verano recién pasado habían encontrado algunas en el Sector de Los Palos. Pero que en esta época de invierno, estarían supuestamente más profundo, en el talud hacia mar abierto de la "pampa". De acuerdo a ellos, si lo requerimos, ellos podrían sacarnos una muestra de machas de 50 o más ejemplares, para su análisis y ser utilizadas como reproductores.

No obstante, respecto a esa posibilidad, cabe mencionar que el Director Regional de Sernapesca en Iquique nos señaló que él en ningún caso permitirá la introducción de machas desde Perú por la frontera. Previo a cualquier intento de esa naturaleza por tanto habría que ver todas las regulaciones que deberían cumplirse, para poder hacer esa introducción. No obstante, cabe hacer notar que el banco de machas de Tacna es el mismo banco que se proyecta desde Arica. Es la misma playa y es sólo un límite político el que los separa, pero biológicamente es una sóla playa, un sólo banco. Por tanto, desde el punto de vista biológico no debería haber ningún impedimento, pero, por lo manifestado por el Sr. Director Regional de Sernapesca, él lo ve problemático desde el punto de vista sanitario, etc. De tener que acudir a esas machas, que serían las más recomendables de utilizar para una experiencia piloto de repoblamiento, de no encontrar en la propia playa Las Machas, será necesario contar con el apoyo de las autoridades.

Desde Arica hacia el Sur se revisaron las siguientes playas, con el siguiente resultado:

Caleta Vítor: La playa que está inmediatamente en el frente de la quebrada es una playa de gran pendiente, reflectiva, de grano muy grueso. No presenta las condiciones aptas para macha, tampoco se encontraron conchas de machas recientes ni antiguas varadas. No obstante, averiguando con los lugareños nos

señalaron a una persona que había sacado machas en el sector en el pasado. Ubicando a esa persona, nos contó que el solía sacar machas en la Playa Las Jaibas, que queda inmediatamente al norte de la playa Vítor. Sin embargo en el último tiempo no ha visto, pero tampoco ha ido a buscar. En conclusión: ahí habría posiblemente un lugar potencial donde buscar y eventualmente encontrar machas para ser utilizadas como reproductores, en caso de no tener éxito en Playa Las Machas o en Tacna.

Caleta Quebrada Camarones: La playa que está inmediatamente en la boca de la quebrada es una playa reflectiva, de mucha pendiente y energía, de arena gruesa, no apta para macha. Conversando con los pescadores, nos mencionaron dos playas en que alguna vez hubo machas en el pasado. En el último tiempo no se ha buscado y no saben si hay. Estas son la Playa la Española y La Cortina. A ambas playas sólo se accede en bote, no tienen acceso por tierra. Ambas playas también podrían ser potenciales lugares donde encontrar reproductores.

Sector de Pisagua: De acuerdo a antecedentes entregados por personal del IFOP en Iquique, y luego averiguando con los pescadores de Pisagua, nos señalaron que en el Sector de Los Morros habría playas en que alguna vez se han sacado machas. Se realizó un recorrido del Sector. En primer término, se buscó en la playa que queda en la boca de Quebrada Tiliviche. Esta es una playa de mucha pendiente, reflectiva, arena muy gruesa. Solo en su extremo sur presenta un sector de playa mas plano, formándose una pequeña “pampa”. No obstante, en todo ese sector la arena está muy mezclada con palos, probablemente producto de las bajadas de la quebrada. No se encontró ninguna concha de macha, ni señales que pudieran haber machas en ese sector. Más hacia el norte, en el Sector de Los Morros, había dos playas muy planas, de arena fina, en las cuales se encontró conchas de machas varadas, pero todas antiguas (ya sin periostraco). En los conchales prehistóricos que hay en el sector también se encuentran conchas de machas, señalando que ese sector habitualmente ha tenido machas. Es muy probable que actualmente aún tengan machas pero, por

referencias de los pescadores, no en cantidades que sustenten una pesquería, ni siquiera a un nivel de consumo de los propios pescadores. Pero posiblemente es otro lugar potencial donde encontrar reproductores. A la hora que se estuvo en la playa, la marea estaba alta, de modo que no era posible verificar en forma directa la existencia de machas en el submareal somero.

Playa Brava – Iquique: en esa playa se encontraron conchas de macha, pero antiguas. De acuerdo a informaciones entregadas por el IFOP, en esa playa antiguamente hubo machas.

Playa El Aguila – Iquique: en esa playa se encontraron conchas de machas con periostraco, lo cual señala que son recientes. Por tanto, esa playa parece tener actualmente machas. En el momento de recorrer la playa la marea estaba alta, de modo que no era posible buscar machas en el agua.

Playa Chomache: no se encontraron conchas en la playa. No obstante, en muestreos realizados por Eduardo Jaramillo (U. Austral de Chile) encontró machas en el intermareal.

Playa Ike-Ike o Peruana: habían conchas de machas en la playa, pero antiguas.

Playa Chipana: no se logró revisar, sin embargo, de acuerdo a muestreos realizados por Eduardo Jaramillo (U. Austral de Chile) en esa playa encontró machas en el intermareal.

Playa Hornitos: en esa playa se encontraron conchas varadas en la playa y, conversando con los pescadores, actualmente habrían machas.

Playa Mejillones: de acuerdo a conversaciones con pescadores de Mejillones, en su extremo norte solía haber machas, pero en la actualidad no se sabe.

Conclusión del recorrido: No hay en todo el sector norte ninguna sóla playa en que exista actualmente un banco de machas que pudiera permitir un traslado masivo de adultos hacia la playa Las Machas de Arica. No obstante, existe una serie de playas en que podrían haber machas para ser utilizados como reproductores. En al menos dos sitios (Las Machas – Arica y Los Palos –Tacna) los pescadores locales nos aseguraron que ellos nos podrían proveer machas para muestra o reproductores. De acuerdo a nuestros protocolos, esas machas podrían utilizarse directamente con fines de repoblamiento, sin mayores análisis genéticos o de enfermedades o pestes. Pues ellas pertenecen al propio banco a repoblar, lo que constituye la situación ideal.

En verano, se recorrió la costa de la Playa Las Machas de Arica, la extensión de esta playa en territorio peruano, el sector sur de Iquique y Playa Hornitos, al norte de Antofagasta. Este último sector evidencia una recuperación importante de machas pero no a niveles tales que pueda actuar como población donante. En la playa de Arica y en Perú una vez más no se recolectaron machas, en donde las conversaciones con lugareños ahora mostraban un pesimismo respecto a la posibilidad de encontrar machas.

La información recopilada sobre los bancos de machas desde la III Región al Sur, y que actualmente se encuentran productivos, dio como resultado que, entre los bancos más representativos se encuentran:

Caleta San Pedro – Bahía Coquimbo: Banco de machas que ha evidenciado una notoria recuperación desde el 2001, siendo el de mayor extensión y producción de la zona centro y norte de Chile. Actualmente se encuentra dentro de un Área de Manejo.

Playa Tongoy: Banco localizado aproximadamente a 30 km al sur de Coquimbo y en la actualidad se encuentra muy disminuido. Desde este se extraen machas sólo para el comercio local.

Nehuentué: Extenso y productivo Banco de machas localizado en la costa de la IX Región y que suministra machas para el comercio de la zona. No fue visitado por nuestro equipo de trabajo, obteniendo las muestras utilizadas en nuestro estudio a través de terceros, no obstante, en el marco del presente proyecto.

Cau-Cau: Extenso y productivo Banco de machas localizado en la costa expuesta de la Isla Grande de Chiloé y que suministra macha para la industria pesquera de la zona. Al igual que el banco de la localidad de Nehuentué, esta localidad no fue visitada por nuestro equipo de trabajo, siendo las muestras utilizadas en nuestro estudio obtenidas a través de terceros, no obstante, en el marco del presente proyecto.

Si bien la decisión de cuál podría ser la población donante debía quedar supeditada a la aplicación de los protocolos, hubo un aspecto práctico ineludible: la población más próxima que por su tamaño puede ser la donante está en la Bahía Coquimbo, y las segundas más próximas están en la novena y décima Región. Se había pensado, también, en la población que se encontró en Playa Hornitos (Segunda Región) la cual, por cercanía, debería ser el candidato natural. Sin embargo, esa población es muy pequeña, está recién recuperándose, de modo que al sacar una gran cantidad de individuos de ella habría causado un daño. En este contexto, y siguiendo los criterios sugeridos por los expertos invitados al workshop, es que primero se debe analizar lo que en la práctica se puede realizar y luego, dentro de las posibilidades y aplicando los protocolos, elegir la que minimice los riesgos o problemas eventuales. En nuestro caso no había más que un candidato. El banco de machas identificado como posible donante se encontraba en el sector Caleta San Pedro, al norte de la Bahía Coquimbo.

Diseñada la estrategia de repoblamiento de macha para la Playa Las Machas de Arica (ver punto 2.1.) y definida la potencial población donante, se procedió a aplicar los protocolos.

2.3.2. Protocolo de Traslado: Consideraciones para enfermedades y parásitos

La aplicación del protocolo para enfermedades exige que la población donante tenga la condición de *libre de enfermedades de alto riesgo* (consideradas en Lista 1 y Lista 2). La población que actualmente califica como donante se localiza en el sector de Caleta San Pedro, al norte de la Bahía de Coquimbo. En nuestro país, aún no se implementa un programa oficial de monitoreo de enfermedades de alto riesgo, desconociéndose la condición de *libre de enfermedades de alto riesgo* de la población donante. Sin perjuicio de lo anterior, el protocolo exige la caracterización de parásitos mediante análisis histológico, resultados que se entregan a continuación.

- **Población Donante de Coquimbo**

En las 150 machas muestreadas no se encontró ningún parásito unicelular. El único parásito de tejidos blandos detectado correspondió a un céstodo larval (ver Tabla 1 y Figura 2). Este céstodo se encontró en 18 de las 150 machas estudiadas, lo que da una prevalencia de un 12%. El céstodo, denominado *Rhodobothrium mesodesmatum* (Bahamondes & López, 1962) utiliza a *Mesodesma donacium* como huésped intermedio para, finalmente, madurar en el intestino de la raya *Myliobatis chilensis* (Carvajal 1976).

La población de machas de Coquimbo tiene como epibionte en su concha al poliqueto *Polydora bioccipitalis*, que de acuerdo a estudios previos de Olivares *et al*. (2002) tendría una prevalencia del 16,7%. Este poliqueto se localiza en la cara interna de la concha del sector por donde salen los sifones, generando la macha una ampolla con el mismo material calcáreo de su concha (ver Tabla 1 y Figura 3). Externamente, son evidentes las aperturas en la concha de la machas dejadas por el gusano, lo que facilita enormemente la detección del poliqueto.

- **Población receptora de "Playa Las Machas" de Arica**

Con en objeto de conocer el escenario epidemiológico en el cual serán liberados los animales transpuestos, se sugiere conocer la probable presencia de patógenos considerados en Lista 1 y Lista 2 en el lugar a repoblar. Sin embargo, fue imposible encontrar ejemplares de macha en la "Playa Las Machas" de Arica. La ausencia de machas se extiende a lo largo de toda la playa, incluyendo el sector peruano, haciendo imposible establecer la presencia de los patógenos.

Si bien no se obtuvieron machas vivas de Arica, si se recogieron muchas conchas en la playa. La evaluación de esas conchas muestra que también las machas de Arica portan el poliqueto *Polydora bioccipitalis*, especie que fue originalmente descrito para la costa Iquiqueña.

- **Comentarios a la aplicación del protocolo**

La presencia del céstodo *Rhodobothrium mesodesmatum* como único parásito es de poca importancia. Esto, básicamente, porque no está catalogado en Lista 1 ni en Lista 2, además de poseer una amplia distribución geográfica. Aunque la prevalencia del 12% observada en este estudio resultó ser menor al 17% encontrado en 1976 en el sector de Morrillos, Coquimbo (Carvajal, 1976), ambos valores sugieren una cierta constancia en la prevalencia de este parásito a través del tiempo.

El céstodo también estaba presente en las machas de Arica antes que estas desaparecieran (comunicación personal de pescadores y funcionarios públicos), por lo que tanto la población donante como la receptora tienen la misma característica en ese aspecto. De este modo, al trasladar machas que portan el céstodo desde Coquimbo a Arica, no se estaría introduciendo al parásito a una zona libre de él. El mismo comentario vale respecto a la epibiosis por *Polydora bioccipitalis*, que está presente en ambas poblaciones.

En conclusión, la población de machas presente en el sector Caleta San Pedro, Coquimbo, desde el punto de vista de las enfermedades, puede proveer animales para un repoblamiento con adultos como también los reproductores necesarios para la obtención masiva de larvas competentes en ambiente controlado.

2.3.3. Protocolo de Traslado: Consideraciones para Caracteres Genéticos

La aplicación del protocolo para caracteres genéticos sólo exige repoblar dentro del rango de distribución de la especie en cuestión. Sin embargo, las recomendaciones apuntan a evaluar y preservar la integridad genética de las poblaciones involucradas, con el objeto de aportar elementos de juicio para tomar la mejor decisión dentro de una actividad de repoblamiento.

A continuación se detallan los resultados del estudio genético.

- **Estudio genético de las Potenciales Poblaciones Donantes**

Las 15 enzimas que revelaron presentaron un total de 19 loci. La enzima PGD mostró la presencia de 2 alelos diferentes en las cinco poblaciones analizadas, el *Pep LLL2* fue polimórfico en Playa Hornitos, Bahía Tongoy, Caleta San Pedro y Cau-Cau, en *Est1* se observaron 2 alelos en las poblaciones de Bahía Tongoy, Caleta San Pedro y Cau-Cau, el *G3PDH* presentó variación en Bahía Tongoy y Cau-Cau, el *Pep LLL1* en Caleta San Pedro y Cau-Cau, mientras que el *Pep LGG* sólo presentó variabilidad en Caleta San Pedro (Tabla 2). Por otro lado, el *PGM*, *SOD*, *MPI*, *ME*, *IDH*, *CAT*, *Pep GL*, *Pep Ala-Met*, *Pep Pro Leu* y *Pep Leu- Ala* mostraron sólo un alelo, no observando variación. La presencia de más de un locus se observó en las enzimas EST, SOD, Pep LLL y Pep Leu- Ala, en cada una de las cinco poblaciones.

Las cinco poblaciones se encontraron en Equilibrio de Hardy-Weinberg, analizadas mediante la prueba de X^2. Los valores de heterocigosidad observada fluctuaron entre 0,04 y 0,16. Nehuentué fue la localidad que presentó una heterocigosidad media observada (Ho) y esperada (He) mayor con respecto a las otras cuatro poblaciones analizadas, con valores de 0,16 y 0,32, respectivamente. En las otras cuatro poblaciones, los valores de heterocigosidad fueron muy similares (Tabla 2). Las muestras provenientes de Cau-Cau y Caleta San Pedro fueron las que presentaron mayor porcentaje de polimorfismo, siendo la de Nehuentué la menos polimórfica (Tabla 2).

Los índices de identidad y distancia genética indican que prácticamente no hay diferencias entre las poblaciones e, incluso, mostrando las poblaciones de Bahía Tongoy y Caleta San Pedro una identidad de 1,0 (Tabla 3 y 4).

- **Estudio Morfométrico de las Potenciales Poblaciones Donantes**

Las machas provenientes de las 5 poblaciones presentaron similitudes y diferencias en su morfometría que, sin embargo, no sugieren una componente genética, sino más bien ambiental (Figuras 4 a 7). No obstante a las diferencia en el tamaño de los individuos, el volumen proyectado respecto al largo sugiere una relación funcional común (Figura 4). La relación largo/ancho tiende a disminuir con respecto al largo en las poblaciones de Playa Hornitos y Bahía Tongoy mostrando una relación inversa en Caleta San Pedro y Nehuentué y, prácticamente, no variando en la población de Cau-Cau (Figura 5). La relación largo/largo umbonal fue prácticamente la misma entre las poblaciones (Figura 6). La mayor diferencia estuvo en el alto de los animales, siendo esta mayor en los individuos de talla media y pequeña de Playa Hornitos (Figura 7).

- **Comentarios a la aplicación del protocolo**

Las condiciones del transporte y la calidad de las muestras de animales constituye un punto crítico para este tipo de estudio genético. Esto, para preservar

la actividad de las enzimas además de asegurar que las enzimas que revelan son las propias de la especie y no del proceso de descomposición. Otro punto importante es el número de individuos muestreados, debido a que si este es bajo será difícil la ocurrencia de individuos heterocigotos o que posean alelos alternativos, lo que nos puede conducir a sub-estimar la variabilidad genética que posee la población.

La variabilidad genética observada en las 5 poblaciones de machas, Playa Hornitos = 0,040, Bahía Tongoy = 0,090, Caleta San Pedro = 0,052, Nehuentué = 0,160 y Cau-Cau = 0,048, fue baja al compararla con otras especies de moluscos. Por ejemplo, la heterocigosidad reportada para *Placopecten magellanicus* fluctúan entre 0,320 y 0,373 (Volckaert & Zouros, 1989), para *Patinopecten yessoensis* entre 0,160 y 0,180 (Kijima et al., 1989, von Brand & Kijima, 1990) y para *Argopecten purpuratus* de 0,186 (von Brand & Kijima, 1990). La baja variabilidad genética que presentan las poblaciones de *Mesodesma donacium*, tanto dentro como entre ellas, sumado a la gran similitud en la identidad genética de las poblaciones, va en favor de la actividad de repoblamiento al permitir la transposición de organismos a través de grandes distancias geográficas.

En conclusión, la población de machas presente en el sector Caleta San Pedro, Coquimbo, desde el punto de vista genético, puede proveer animales para un repoblamiento con adultos como también los reproductores necesarios para la obtención masiva de larvas competentes en ambiente controlado. Aquí, como las poblaciones naturales presentan baja variabilidad, la pérdida de heterocigosidad se ve minimizada.

2.3.4. Protocolo de Traslado: Consideraciones para el Transporte de Organismos Bentónicos

A continuación se reporta la serie de experimentos diseñados para simular el estrés fisiológico al cual pudieran, eventualmente, someterse los animales durante el transporte. Estos apuntaron a imitar las condiciones de traslado.

- **Trabajos realizados en terreno**

- *Experimento T.1. Supervivencia en dos tipos de empaques*

Las machas que se mantuvieron en cajas térmicas se enterraron más rápido, comenzando a enterrarse a los 51 segundos luego del reingreso al agua. Contrariamente, aquellas que se colocaron en mallas se comenzaron a enterrar a los 17 minutos (Figura 8). Al cabo de 60 min se logró enterrar el 96% de las machas mantenidas en cajas térmicas versus un 66% de las mantenidas en mallas.

- *Experimento T.2. Supervivencia en empaques herméticos de plumavit*

La supervivencia de individuos adultos y juveniles de machas fue del 100% en cada uno de los tiempos de experimentación. En estos se logró que todos los individuos se enterraran, lo que en general ocurrió dentro del lapso de una hora. Sin embargo, hubo una general tendencia en que a menor tiempo de permanencia en el empaque, más tiempo tomaron las machas en enterrarse. Los resultados de este experimento se observan en la Tabla 5.

- *Experimento T.3. Supervivencia en empaques herméticos de plumavit: efecto de la talla, hacinamiento y temperatura.*

Los resultados muestran que todos los factores analizados incidieron significativamente en la capacidad de entierro de las machas (Tabla 6). Aquí, las mejores respuestas se obtuvieron siempre con animales grandes, a mayor hacinamiento y a menor temperatura. El análisis también arrojó una única interacción significativa, siendo esta la interacción hacinamiento* temperatura; de acuerdo a la Figura 9, a menor hacinamiento la capacidad de entierro disminuyó a una tasa mayor cuando los animales grandes estuvieron expuestos a una mayor temperatura.

- *Experimento T.4. Supervivencia en bandejas bajo condiciones extremas.*

Luego de 24 h en condiciones extremas, las machas provenientes de la capa superior de la caja más expuesta a los cambios de temperatura - caja superior - lograron enterrarse en un 88%, respecto al 93% observada en las machas de la capa inferior de la misma caja. En estas se observó un 2% y 3% de mortalidad, respectivamente. Las machas provenientes de la caja inferior mostraron un 91% y 96% de entierro con un 2% y 4% de mortalidad, para la capa superior e inferior de machas, respectivamente.

A las 48 h hubo un 100% de mortalidad de las machas provenientes de la capa superior de la caja más expuesta, registrando en la capa inferior un 91% de mortalidad. De las machas supervivientes se lograron enterrar 4. Las machas provenientes de la caja inferior experimentaron un 39% y 6% de mortalidad, lográndose enterrar un 26% y 63% para la capa superior e inferior, respectivamente.

- **Comentarios a los experimentos**

La supervivencia de las machas, estimada a través de la capacidad de entierro de estos animales, permite concluir que ellas pueden ser trasladadas a gran distancia, incluso en condiciones extremas. Esto favorece a aumentar la posibilidad de recurrir a bancos que se encuentran muy distantes, en el momento en que la disponibilidad de animales desde bancos cercanos se reduzca. De esta forma, ejemplares provenientes del banco de machas de Bahía Coquimbo podrían eventualmente ser trasladados hasta la ciudad de Arica, distante a 1.612 km, en un viaje por tierra de por lo menos 24 h. En este traslado, y en la evaluación costo/eficiencia, el uso de empaques en "condiciones extremas" resulta completamente factible.

- **Comentarios a la aplicación del protocolo**

El traslado de machas adultas requirió de la autorización de la autoridad competente, debido a que las machas provenían de un área de manejo. Con el debido consentimiento de la asociación gremial titular, la SUBPESCA autorizó la extracción de la cantidad requerida de machas a través de una pesca de investigación. Este documento sirvió para que la oficina regional del Sernapesca emitiera una Guía de Libre Tránsito. En este sentido, la aplicación del protocolo estuvo libre de inconvenientes, pero estos requerimientos deberían quedar explícitos en el protocolo.

El agua transportada para "refrescar" el cargamento de machas prácticamente se evaporó en su totalidad, mientras que la que escurrió se depositó en tierra, lejos del mar. Sin embargo, el agua utilizada una vez llegado a Arica, mientras el cargamento de machas permanecía aún en el camión, no necesariamente cumplió con el protocolo. Este procedimiento se hizo en tierra, pero no alejado de la costa. Los factores que intervinieron en este accionar fueron (*i*) la urgencia y el acceso al agua de mar, (*ii*) la ausencia de lugares/instalaciones habilitados para tales propósito y (*iii*) el componente cultural de los involucrados en el transporte y la debida toma de conciencia del tipo de acción que se estaba realizando. De alguna manera, todos los involucrados habían participado en el traslado de organismos marinos, pero jamás con los cuidados y consideraciones exigidas en esta ocasión.

2.3.5. Protocolo de Traslado: Consideraciones para la liberación de Organismos Bentónicos

A continuación se reportan los experimentos diseñados para maximizar el éxito en el proceso de liberación de las machas en la actividad de transposición.

- **Trabajos realizados en terreno**

- *Experimento L.1. Respuesta al tamaño de sedimento en función de la talla.*

Las machas mostraron una velocidad de entierro diferencial con respecto a su tamaño, no encontrando diferencias significativas entre sedimentos y entre repeticiones del experimento (Tabla 7). Las machas chicas fueron significativamente más lentas lo que sugiere una mayor probabilidad de barrido por las olas y corrientes en el momento de la liberación. Hubo una interacción marginal entre el tamaño de la macha y el grano del sedimento, lo que puede llegar a ser importante en el momento de elegir el área de liberación. Sin embargo, esto se debió una vez más a la respuesta diferencial de las machas chicas, siendo estas mucho más lentas en sedimentos finos y gruesos al momento de enterrarse (Figura 10).

- *Experimento L.2. Liberación dentro de parches de malla.*

Producto de la alta dinámica en la zona de rompientes de la playa, esto es olas y corrientes, fue bastante complicado la manipulación y montaje de los parches de malla, especialmente a una altura del agua de 0,6 m. Cuando se pudo instalar el parche, se hizo difícil el monitoreo visual debido a la turbidez producida por el oleaje. Sólo fue posible notar que las machas no permanecían dentro del parche. A una altura del agua de 0,2 m, la manipulación y el montaje del parche fue mucho más fácil, pero no se logró establecer la macha. Esto se debió a la formación de canales entre las estacas (grapas) que anclaban el parche al substrato como consecuencia de la resaca, generando la perdida de machas por el arrastre entre estos canales.

Como resultado final, el parche de malla no cumplió con el objetivo de facilitar el establecimiento y entierro de las machas en la zona de rompientes. La

principal causa fue a su difícil manipulación y el escape de las machas producto de las fuertes corrientes existentes en el hábitat natural de las machas.

- *Experimento L.3. Liberación dentro de "candiles".*

La liberación de machas en los candiles resultó bastante exitosa. Una vez liberadas por las orillas de los candiles, las machas inmediatamente se enterraron y de manera muy activa, minimizando con esto el arrastre por las olas. Cuando fueron liberadas directamente al fondo de los candiles, el comportamiento fue muy similar. Sin embargo, en ocasiones cuando fueron depositadas simultáneamente varias capas de machas, los individuos de las capas más superiores fueron arrastradas por la resaca con cierta facilidad. Seguidamente, si estas machas quedaban dentro del candil, su entierro se producía a los pocos segundos.

- **Comentarios a los experimentos**

La liberación de machas dentro de los candiles maximiza el éxito de la liberación, estableciéndose rápidamente los animales liberados. Básicamente, dentro de la dinámica de las playas arenosas que son el hábitat natural de las machas, la presencia de los candiles frena la resaca lo que genera turbulencia dentro de ellos. Esto hace que tanto en las orillas de los candiles como el fondo de ellos se forme un substrato poco compactado facilitando el entierro activo y, probablemente, el entierro pasivo de las machas. Finalmente, también se concluye que para una exitosa liberación de machas, no se debiera utilizar estructuras de sujeción.

2.3.6. Resultado de la experiencia piloto: repoblamiento con adultos

- **Evaluación inicial**

A las 08:00 h del día domingo 26 de enero 2003 comenzó la liberación de las machas en la Playa Las Machas de Arica. Durante esta acción, se procedió a

cuantificar la supervivencia de los animales luego del traslado, evaluando la supervivencia de 2 grupos. Un primer grupo, Grupo 1, correspondió a las machas de las bandejas de la parte posterior del camión (cerca de la puerta), tomando una muestra al azar desde cada bandeja que arrojó un N = 273 machas. Un segundo grupo, Grupo 2, correspondió a las machas de las bandejas de la parte anterior del camión, desde donde se obtuvo un N = 403 machas.

La supervivencia estimada para el Grupo 1 fue del 97,1% mientras que para el Grupo 2 fue igual al 55,8%. Finalmente, y de acuerdo a una impección visual de cada caja, se estimó una mortalidad total durante el traslado de un 27,5%.

La prueba de vitalidad realizada con un N = 60 machas provenientes del Grupo 1, en la cual se midió el porcentaje y velocidad de entierro, arrojó un 48,3% de machas enterradas. Este valor fue el punto de partida para evaluar la evolución de la condición de las machas en su nuevo hábitat.

Las machas fueron liberadas en los candiles de dos áreas, muy próximas entre sí, cuyas coordenadas fueron establecidas con GPS y correspondieron a: Área A, 18º 23' 13,1'' S y 70º 20' 40,2'' W; Área B, 18º 23' 17,0'' S y 70º 20' 37,8'' W. Estas ocuparon una extensión de playa de 300 m de largo y 25 m de ancho, con un área aproximada de 0,75 Há. La densidad de liberación fue estimada en 67 machas·m^{-2}. El tamaño promedio de las machas liberadas fue de 63,3 ± 3,64 mm (N = 250).

- **Evaluación de la liberación**

27 de Enero de 2003: se procedió a monitorear la zona de liberación, tanto por el intermareal como por el submareal. No se observaron machas varadas pero se registró la presencia de algunas machas muertas, con y sin partes blandas, las que eran arrastradas por las olas. En el submareal, se observaron machas vivas y distribuidas en parches, principalmente en los candiles.

28 de Enero de 2003: se procedió a monitorear cuantitativamente el área de liberación, tomando una muestra de *n* = 27 *cores*. Se registró una densidad promedio de 6,7 machas·m^{-2}. Mediante buceo, se recolectaron 100 machas para la prueba de condición. De estas, el 51% se logró enterrar el cabo de 120 min.

29 de Enero de 2003: se realizó una impección visual del área de liberación, tanto por el intermareal como por el submareal. En el intermareal se observaron 2 machas varadas mientras que en el submareal se encontraron 5 machas muertas, todas sin partes blandas. En el submareal, no fue posible encontrar machas vivas.

30 de Enero de 2003: se procedió con el segundo monitoreo cuantitativo en el área de liberación, tomando una muestra de *n* = 27 *cores*. Esto arrojó una densidad promedio de 0 machas·m^{-2}. Sin embargo, mediante buceo se logró recolectar 74 machas para la prueba de condición. Luego de 120 min, el 96% de estas machas se logró enterrar.

31 de Enero de 2003: se realizó una impección visual del área de liberación, tanto por el intermareal como por el submareal. No se observaron machas muertas ni tampoco varadas. En el submareal, no se observaron machas vivas.

01 de Febrero de 2003: se procedió con el tercer monitoreo cuantitativo en el área de liberación, tomando una muestra de *n* = 27 *cores*. Nuevamente, el muestreo arrojó una densidad promedio de 0 machas·m^{-2}, sin embargo, en esta ocasión tampoco se pudo encontrar machas para la prueba de condición.

02 de Febrero de 2003: se procedió con un último monitoreo general en el área de liberación, realizando en conjunto la inspección visual y el muestreo cuantitativo. El monitoreo arrojó 0 machas en los *cores*, no observando machas varadas, machas muertas ni tampoco animales vivos.

El estudio histológico de la muestra de machas obtenida después del segundo día de liberación, mostró que del total de 32 machas analizadas sólo 1 animal no había desovado (Tabla 8; ver Figura 11 para un ejemplo de gónadas recién desovadas en animales muestreados en Arica). Aunque no se realizó un estudio histológico de animales en el momento de ser embarcados a Arica, el análisis visual de las machas indicaba la presencia de gónadas maduras no desovadas, Además, mientras permaneció el camión en Arica con las machas antes de la liberación, y luego de mojar el cargamento para refrescar a las machas, se notó, en el agua que escurrió, señales que indicaban presencia de gametos (espuma blanca). De este modo, y aunque pudo ocurrir una liberación importante de gametos dentro del camión, se cree que el mayor desove ocurrió en la Playa Las Machas de Arica.

- **Evaluaciones Posteriores**

29 de Marzo de 2003: se procedió a muestrear el submareal somero e intermareal bajo de las 18 estaciones distribuidas a lo largo de la Playa Las Machas de Arica. La evaluación arrojó una total ausencia de machas adultas y juveniles, tanto en la zona de liberación como a lo largo de la playa. La georeferenciación de las estaciones en donde se realizaron los muestreos se entrega en la Tabla 9.

15 - 16 de Mayo de 2003: se procedió a muestrear el submareal somero e intermareal bajo de 25 estaciones distribuidas a lo largo de la Playa Las Machas de Arica y 14 estaciones en la playa del territorio Peruano. La evaluación arrojó una total ausencia de machas adultas y juveniles. La georeferenciación de las estaciones de muestreo se entrega en las Tabla 10 y 11.

- **Comentarios a la Experiencia de Liberación**

De acuerdo a los resultados referentes al traslado podemos concluir que fue exitoso, aunque la supervivencia pudo haber sido mayor. Esto se debió a

problemas mecánicos en el transporte, ajenos al empaque, prolongando innecesariamente a las machas al estrés fisiológico. Este aspecto no es trivial dado que, ya sea por favorecer a un actor importante dentro de la experiencia (por ejemplo al gremio de los macheros) y/o por costos, el resultado puede estar entre el éxito o el fracaso. En segundo lugar, la liberación de machas dentro de los candiles mostró el comportamiento esperado, comenzando inmediatamente y de manera activa el enterrado; esto estuvo facilitado por las buenas condiciones oceanográficas del momento, teniendo en consideración el tipo de ambiente donde habitualmente se encuentra la macha, el cual tiene un fuerte oleaje. En el área de liberación, la condición de las machas mejoró notoriamente dentro de los primeros 4 días, sin embargo, hubo una progresiva disminución en las densidades no siendo posible su detección luego del sexto día.

Aunque la literatura y nuestra experiencia nos indicaba la alta movilidad que experimentan los parches de machas dentro de un banco, nuestra expectativa era que, en presencia de una baja tasa de dispersión, la probabilidad de ubicar el parche se maximizaba. El no poder encontrar machas con el arte de muestreo, cores, y luego en la búsqueda manual por una extensa zona, nos sugiere que la dispersión fue alta. Creemos que la alta dinámica de la playa dispersó las machas a una tasa no prevista, esto tanto horizontal como batimétricamente, y el que no hayamos podido detectarlas no sería un artefacto del muestreo. De hecho, el escaso registro de machas muertas y/o varadas, y por el progresivo aumento de la vitalidad de las machas recolectadas, sugiere una rápida aclimatación de las machas a sus nuevas condiciones. Según versiones de los pescadores locales, la macha se estaría desplazando hacia zonas más profundas en busca de agua más frías y substrato más blando. Sin embargo, y a la luz de las observaciones, esto aún permanece como una incógnita ya que, como parte de un Seguimiento del Area de Manejo (Realizado por IFOP, II Región), se evaluó mediante bote y a través de buceo el submareal del área en donde se llevó a cabo la liberación, no encontrando ninguna macha. Pero, considerando la extensión del área y el

tamaño relativo de un parche de pocas decenas de metros, resulta poco probable su encuentro.

Los muestreos de Marzo y Mayo una vez más no registraron la presencia de adultos en la zona intermareal y submareal somero. Sumado a esto, la total ausencia de juveniles de machas nos mostró que la apuesta en la estrategia de liberación no dio los resultados esperados en el corto plazo. Si bien las machas desovaron inmediatamente, esto fue generado por el estrés del traslado, con cambios de temperatura muy grandes. Y ese tipo de desoves, generalmente, producen gametos de pobre calidad (más producto de un aborto, que de un desove). Y, considerando lo avanzado del verano, es poco probable que esas mismas machas lograran madurar y desovar nuevamente. Si es que al menos parte del parche permanece junto hasta el próximo período de desove, quedaría una pequeña posibilidad que en el próximo año se registre un reclutamiento. Esto deberá ser evaluado en el otoño del año 2004.

Esta forma de repoblamiento ha resultado ser exitosa en otras especies, pero el éxito, más que estar condicionado por la biología de las especies, lo estaría más bien, por el hábitat donde éstas se desarrollan. Los resultados exitosos obtenidos en ostras y almejas provienen de experiencias realizadas en sistemas de bahías o de sub-estuarios, bastante protegidos, con sistemas de circulación de corrientes que facilitan la mantención de los adultos repoblados en el sitio de liberación, como también la retención larval. además, al estar conformado por unidades discretas, estos sistemas en sí son menos dinámicos, minimizan la dispersión pasiva de los animales y el de los parches, factores que en su conjunto favorecen la permanencia local de los animales.

Contrariamente, el hábitat de las machas y, especialmente, el requerido para la experiencia piloto de liberación, Playa Las Machas de Arica, corresponde a un hábitat muy expuesto, altamente dinámico y de decenas de kilómetros de extensión. A lo largo de las playas, sobre todo de estas tan expuestas, se

generan fuertes corrientes a lo largo, luego corrientes de resaca, que difícilmente permiten la retención larval en un punto determinado de la playa. Pero, considerando lo extenso de la playa (más de 50 Km, incluyendo su continuación en el lado peruano), es posible que las larvas no sean sacadas de la playa como tal y, al momento de metamorfosear, encontrar un ambiente apropiado para asentarse. Considerando el viento predominante del sur-oeste y, por tanto, un desplazamiento predominantemente hacia el norte, el hecho de haber liberado las machas cerca de su extremo sur, favorece que las eventuales larvas logren asentarse antes de ser sacadas de la playa en su extremo norte. Sin embargo, este proceso no se observó, pero habrá que esperar un nuevo ciclo hasta fines del presente año. Aunque un número aproximado de 100.000 animales se ve grande, los dos parches creados en el momento de la liberación se mostraron como poco ubicables en el tiempo, posiblemente por dispersión, o porque el parche se movió, perdiéndose como tal, en la inmensidad de este escenario. Más que llamarnos la atención sobre la viabilidad de este tipo de actividad, los resultados más bien nos sugieren un éxito diferencial de los futuros programas y/o estrategias de repoblamiento para las especies que habitan la costa chilena. Hábitat más discretos y/o de pequeña extensión de costa, por ejemplo, bahías protegidas y canales, aparecen como ambientes más propicios para programas de repoblamiento, en relación a aquellos más expuestos y/o de gran extensión como el del presente estudio.

2.3.7. Resultado de la experiencia piloto: repoblamiento con larvas

- **Evaluación inicial**

Las coordenadas del sector donde se procedió con la liberación de larvas fueron establecidas con GPS y correspondieron a 18º 26' 32,9'' S y 70º 18' 16,4'' W. Las larvas en el momento de la liberación se encontraban en buen estado, algunas nadando y otras adherida a las paredes y fondo del balde, probablemente

reptando. Esto último es correcto debido a que, en la impección realizada durante el empaque, algunas larvas ya evidenciaban un pie desarrollado.

- **Evaluaciones Posteriores**

En los muestreos realizados en Marzo y Mayo, tanto en el lugar donde fueron liberadas las larvas como a través de toda la extensión de la Playa Las Machas de Arica y en el sector peruano, se estableció la total ausencia de reclutas y juveniles de machas.

- **Comentarios a la Experiencia de Liberación**

De una cantidad aproximada a 1 millón de larvas liberadas, es imposible adelantarse a un pronóstico de cuántas larvas sobrevivirán al asentamiento, a la metamorfosis y al reclutamiento. Lo que sabemos es de lo complejo y dinámico que son estos procesos y que el reclutamiento se maximiza mientras mayor es la cantidad de larvas disponibles. De este modo, un millón de larvas competentes es un número bajo al compararlo con el número de larvas que finalmente se traduce en las densas agregaciones de machas “arroz”.

Sin embargo, a nivel local, el millón de larvas podría ser importante en la formación de un pequeño parche. Aquí, es relevante la conclusión alcanzada en la experiencia de liberación con adultos. Si el escenario favoreciera la retención larval y/o de un menor dinámico, una cantidad cercana al millón de larvas podría asegurar un relativo éxito. De este modo, y en consideración a futuros programas de repoblamiento utilizando larvas competentes, el tipo de hábitat una vez más podría estar condicionando el éxito/fracaso de la acción. Esto, por pequeño que sea el número de larvas con respecto a la cantidad de larvas suministrada por el ambiente en un momento dado.

La experiencia piloto de repoblamiento con larvas competentes de machas, producidas masivamente en ambiente controlado, resultó poco practicable, al existir un cuello de botella en el cultivo larval. El cuello de botella en el cultivo fue el rango de talla de 140–160 μ (aproximadamente 9 días de cultivo). Luego que el único *batch* con que se llegó a larvas pedivelígeras haya resultado del único desove que pudo ser fácilmente inducido, nos sugiere que el acondicionamiento adecuado de los reproductores y, en consecuencia, la calidad de los gametos son los principales obstáculos a salvar. Sin embargo, y aunque existen altas expectativas en acciones de repoblamiento usando larvas, las experiencias realizadas al respecto aún no han dado resultado exitosos (Arnold, 2001). Las experiencias no son muchas lo que indica un largo camino por recorrer en la solución de aspectos técnicos – producción masiva de larvas – y en la ecología larval, incluyendo los procesos oceanográficos costeros y los involucrados en el asentamiento. Sin embargo, considerando la dinámica del ambiente de playa de arena, y habiendo salvado los problemas técnicos del cultivo larval, la liberación de larvas que están prontas a metamorfosear, podría resultar una buena alternativa, pues se reduciría al máximo el tiempo necesario de retención. Sin embargo, su viabilidad depende probablemente de la cantidad de larvas, que deben ser del orden de muchas decenas o centenas de millones.

2.3.8. Conclusiones Generales de la aplicación de los Protocolos y Experiencia Piloto

La aplicación de los protocolos fue exitosa, fueron operativos en términos administrativos y el ambiente pudo ser resguardado: (*i*) se minimizó el riesgo de propagar enfermedades consideradas en Lista 1 o Lista 2, (*ii*) fue posible visualizar los riesgo asociados con la genética de las poblaciones involucradas, resguardando la integridad genética de la especie, (*iii*) se cumplió con la normativa vigente en el traslado de organismo y (*iv*) si bien la disposición de los residuos e higiene en general fue un punto bajo, esto fue mínimo y fácilmente solucionable en la logística de una acción de repoblamiento. Como era de esperar en una

normativa – protocolos –, el éxito del repoblamiento no estuvo sujeto a su aplicación. El éxito del repoblamiento es un problema biológico, ecológico y técnico que, más que ser regulado por la Autoridad, esta debería velar porque sus resultados sean registrados debidamente para evitar cometer varias veces los mismos errores. Aquí, toma relevancia el que la Autoridad, al autorizar una actividad de redoblamiento que no contiene riesgo ambiental, genético o de enfermedades, establezca un buen sistema de registro de sus resultados.

2.4. Conclusiones del Proyecto

Los objetivos planteados en la propuesta fueron cumplidos, desarrollando protocolos *ad hoc* (objetivos 1 al 4) y aplicándolos en una experiencia piloto (objetivo 5). Sin embargo, en esto último no se obtuvo, en el marco del proyecto, un registro de los resultados esperados respecto a la estrategia de repoblamiento diseñada. En el desarrollo del proyecto, logramos establecer la carencia total de experiencias relevantes en nuestro país, adecuadamente documentadas en la literatura científica o en programas de repoblamiento de recursos bentónicos, certificadamente probados. Esto no fue una sorpresa debido que, a pesar de existir un gran cuerpo teórico-práctico de experiencias publicadas en la literatura científica internacional relacionadas con el repoblamiento de recursos bentónicos, sólo en contados casos los programas de repoblamiento han resultado ser una realidad.

Con el propósito de resguardar a los recursos y al ambiente frente a acciones de repoblamiento, más allá de lo que la operatividad de los protocolos puedan hacer, es que se vio la necesidad de desarrollar un *Proceso para la Autorización de una Acción de Repoblamiento*. En este proceso, se debe documentar debidamente a la Autoridad que la acción propuesta posee las bases técnicas, biológicas y ecológicas que aseguran el relativo éxito de ella. Esto, además, nos alerta sobre la dirección de los esfuerzos y recursos puestos en los estudios tendientes a maximizar la producción de las poblaciones de especies

hidrobiológicas, real o potencialmente, susceptibles al colapso. De este modo, frente a los recursos puestos para el desarrollo de las técnicas de producción masiva de juveniles de invertebrados en ambiente controlado – *hatchery* –, debería haber un esfuerzo similar para desarrollar el conocimiento, estrategias de protección y manejo de poblaciones naturales (bancos). Esto último, dado su real éxito, sigue siendo la estrategia sugerida en la literatura mientras aún queden poblaciones naturales de un recurso en riesgo.

2.5. Reconocimiento

El banco de machas donante, en la Bahía Coquimbo, es parte de un área de manejo del cual es titular la organización de pescadores artesanales de Caleta Peñuelas. Sin embargo, en su administración y explotación es compartida con las organizaciones de Caleta Coquimbo y Caleta San Pedro. Por tanto, se requería de la colaboración de ellas para obtener las machas a ser trasladadas. Estas organizaciones en conjunto decidieron realizar una donación a la organización de Arica de las 100.000 machas solicitadas. Esta es una actitud muy destacable y es una muestra de solidaridad entre las organizaciones de pescadores artesanales. Con el fin de que sea debidamente valorada, en el momento de la extracción, desembarque y despacho del camión se consiguió la prensa. Hubo un pequeño reportaje en el noticiero regional de Televisión Nacional, como también un artículo en el diario El Día con fecha 27 de Enero de 2003 (se adjunta fotocopia en el Anexo IV junto al CD). En Arica se prefirió omitir esta difusión, para no llamar la atención sobre la presencia de machas, que pudiera generar una extracción clandestina de ellas. Se hará la debida difusión más adelante, una vez que se obtengan resultados del repoblamiento.

SECCIÓN 3. OTRAS ACTIVIDADES COMPROMETIDAS

3.1. Reuniones bimensuales con la Subsecretaría de Pesca

En respuesta a la carta enviada al Sr. Subsecretario de Pesca con fecha 30 de agosto 2002, solicitando la nominación de nuestra contraparte en dicha repartición, se comunicó que había sido encomendada la tarea al Sr. Gustavo San Martín. A su vez, el Sr. San Martín le solicitó también colaboración a sus colegas Sras. Georgina Lembeye y Ana Skarmeta.

- **Reuniones realizadas:**

8 de Octubre 2002: se realizó una primera reunión en las oficinas de la Subsecretaría de Pesca en Valparaíso. Asistieron: Wolfgang Stotz, Gustavo San Martín, Georgina Lembeye y Ana Skarmeta. En esa oportunidad, el Sr. Stotz hizo una presentación general del proyecto y su estado de avance. Luego, se conversó en general sobre los protocolos que se habían entregado en el segundo informe. Seguidamente, se acordó realizar una reunión en Coquimbo para revisar en detalle esos protocolos. La reunión fue fijada para el día 21 de Octubre de 2002, en dependencias de la Universidad Católica del Norte en Coquimbo.

21 de Octubre 2002: reunión realizada en dependencias de la Universidad Católica del Norte, en Coquimbo. Asistieron: Elisabeth von Brand, Karin Lohrmann, Domingo Lancellotti, Loreto Rodríguez y Wolfgang Stotz por el equipo ejecutor del proyecto. De la Subsecretaría de Pesca asistieron: Georgina Lembeye, Gustavo San Martín y Ana Skarmeta. En la reunión, que duró todo un día, fueron revisados uno por uno los protocolos. Para ello se proyectaron punto por punto y se comentaron. Los principales comentarios fueron:

i) Se hace necesario definir claramente lo que se considera repoblamiento. Elementos para ello: se trata del traslado de especies dentro de sus límites

de distribución geográfica, con el fin de recuperar poblaciones deterioradas o aumentar la producción de poblaciones sometidas a explotación. Puede ser traslado de larvas, juveniles o adultos.

ii) Se debería incorporar, en general, un análisis de riesgo versus beneficios esperados de una actividad de repoblamiento

iii) Los protocolos propuestos son, en general, demasiado exigentes y de difícil aplicación en la práctica. Ello podría desincentivar, de manera importante, que se lleven adelante iniciativas de repoblamiento.

9 a 12 de Noviembre 2002: En el workshop asistieron por parte de la Subsecretaría de Pesca el Sr. Gustavo San Martín y la Sra. Georgina Lembeye. El Sr. San Martín hizo una presentación respecto a la legislación vigente que atañe al repoblamiento. Luego, y en el marco del workshop, ambos participaron de las discusiones que se dieron en los talleres de revisión de protocolos.

22 y 23 de Mayo 2003: reunión realizada en dependencias de la Universidad Católica del Norte, en Coquimbo. Asistieron: Karin Lohrmann, Domingo Lancellotti y Wolfgang Stotz por el equipo ejecutor del proyecto. De la Subsecretaría de Pesca asistieron: Georgina Lembeye, Gustavo San Martín y Ana Skarmeta. En la reunión, que duró la tarde del 22 y la mañana del 23, fueron revisados uno por uno los protocolos. Para ello se leyó punto por punto y se comentaron. Los comentarios entregados por los profesionales de la SUBPESCA fueron incorporados en una versión pre-definitiva la que fue remitida, vía *e-mail*, a estos profesionales para su revisión final. La versión que incorporó las últimas consideraciones por parte de la SUBPESCA nos la remitió el Sr. San Martín y es la que finalmente se entrega en este informe.

3.2. Personal participante

Los nombres de los profesionales y técnicos que ejecutaron las actividades más relevantes para cada uno de los objetivos, durante los 18 meses que duró el estudio, se encuentran en el Anexo VI. Personal Participante por Actividad.

SECCIÓN 4. LITERATURA CITADA

4.1. Literatura consultada Tema Enfermedades

Bahamondes, N. & M. T. López. 1962. *Proboscidosaccus mesodesmatis* n. sp. parásito de *Mesodesma donacium* Lamarck. Invest. Zool. Chil., 8: 43-56.

Blackbourn J, Bower SM, Meyer GR (1998). *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Canadian Journal of Zoology 76: 942-953.

Campalans M (2002). Pathologies affecting Chilean cultivated molluscs Restoration of Benthic Invertebrate Populations: Genetics, Diseases & Ecology, pp 22-23.

Campalans M, Gonzalez M, Rojas P (1998). Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Ciloé Island (Chile). Bulletin European Association of Fish Pathol. 18: 93-95

Campalans M, Rojas P, Gonzalez M (2000). Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. Bulletin European Association of Fish Pathol. 20: 31-33

Cañas P, Lozada E (1987). Nota sobre un tremátodo digeneo endoparásito del loco Concholepas concholepas Brugiere 1789 (Gastropoda: Muricidae). Parasitología al Día 11: 173-176

Carvajal J (1976). Machas infestadas con larvas de céstodos tetrafilididos en Coquimbo. Chile Pesquero 1976: 9-10

Ford SE (1996). Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States:response to climate change? Journal of Shellfish Research 15: 45-56

Ford SE (2001). Pests, parasites, diseases, and defense mechanisms of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. In: Castagna JNKM (ed) Biology of the Hard Clam. Elsevier Science, pp 591-628

Gonzalez M, Rojas P, Campalans M (1999). Anomalías celulares en larvas de ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) provenientes de cultivo. Investigaciones Marinas 27: 11-114

Hine PM (1996). Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 15: 563-577

Lohrmann K (2002). The value of surveys on healthy populations: scallops as an example Restoration of Benthic Invertebrate Populations: Genetics, Diseases & Ecology

Lohrmann KB, Brand AR, Feist SW (2002). Comparison of the parasites and pathogens present in a cultivated and in a wild population of scallops *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819) in Tongoy Bay, Chile Journal of Shellfish Research

Lohrmann KB, Feist SW, Brand AR (2000). Microsporidiosis in queen scallops (*Aequipecten opercularis* L.) from U.K. waters. Journal of Shellfish Research 19: 71-75

Oliva M (1988). Aspectos cuantitativos de la infección por Proctoeces humboldti (Trematoda: Fellodistomidae) en la lapa *Fisurella crassa* (Mollusca: Archaeogastropoda). Revista Chilena de Historia Natural 61: 27-33

Oliva M, Díaz M (1992). An ecological approach to the study of infection of Proctoeces lintoni (Digenea, Fellodistomidae) in the key hole limpet, Fisurella limbata Sowerby, 1835 (Archaeogastropoda) from northern Chile. Acta Parasitologica 37: 115-118

Osorio C, Castillo M (1984). Almejas comestibles (*Venus antiqua*) infectadas por tremátodos. Parasitología al Día 8: 117-118

Elston, R. A. (1986). Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. Diseases Aquatic Organisms 2: 49-54

Rojas P, Campalans M, Gonzalez M (1999) Hemocytic neoplasia in the Chilean oyster (Tiostrea chilensis) cultured in the south of Chile: new record. Investigaciones Marinas 27: 15-18

Shaw BL, Battle HI (1957). The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica*. Canadian Journal of Zoology 35: 325-347

Sindermann CJ (1990). Disease in shellfish culture Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Academic Press, Inc., pp 311-356

Venegas C (2002). Diseases as a limiting factor on crustacean restoration: emphasis on the health status management and OIE notifiable diseases Restoration of Benthic Invertebrate Populations: Genetics, Diseases & Ecology, Coquimbo, Chile, pp 71-72

4.2. Literatura consultada Revisión Genética

Nota de la autora: se adjunta no sólo la literatura citada, sino también todas las referencias de Genética de Moluscos chilenos encontradas, independiente de su carácter final.

Aebersold, P., Winans, G,Teel, D., Milner, G., & F. Utter. 1987. Manual for Starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation. NOAA Technical Report NMFS.61,19pp.

Amar, G., C. Palma – Rojas & E. von Brand 1998. Cariotipo del molusco Mesodesma donacium (Bivalvia: Mesodesmatidae). XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, La Serena – Chile. Resumen, p. 81.

Amar, G. 2001. Cariotipo cuantitativo de Mesodesma donacium (Bivalvia: Mesodesmatidae). Tesis para optar al título de Biólogo Marino, Universidad católica del Norte, 55 pp.

Astorga, M. 1990. Relación entre la heterocigosidad y la tasa metabólica de Argopecten purpuratus. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Resumen. p.29.

Astorga, M. & R. Galleguillos. 1991. Relación heterocigosidad, tasa de crecimiento y tasa metabólica en Chlamys (Argopecten) purpurata (L.). XI Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen. p.9.

Ayala, J. & J. Kiger. 1984. Genética Moderna. Ed. Omega. España. 836 pp.

Bodini, A. 1998. Inducción a triploidía en el ostión del Norte Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) por medio de 6-DMAP. Memoria para optar al título de Ingeniero en Acuacultura, Universidad Católica del Norte, 49 pp.

Bodini, A. & E. von Brand 1996. Comparación de la efectividad en inducción a triploidía de 6-DMAP y citocalasina – B en el ostión del norte Argopecten purpuratus. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Coquimbo - Chile, Resumen, p.100.

Bordagaray, G., G. Merino & E.von Brand. 1997. Efecto de la concentración de oxígeno durante el período postfertilización en la supervivencia de larvas D del ostión del Norte (Argopecten purpuratus). XVII Congreso de Ciencias del Mar, Santiago - Chile, Resumen, p. ...

Bustos, E., R. Guíñez, E. Olavarría, A. Paredes & J. Valencia. 1991. Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblación de recursos bentónicos. II. Investigaciones en la ostra chilena, Tiostrea chilensis (Philippi, 1845); Tecnología de Producción de Juveniles y Selección Genética. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo e Instituto de Fomento Pesquero IFOP (Chile). Informe Técnico. 23 pp.

Canello, F.& L. Paredes. 1992. Inducción a la Triploidía en el ostión del Norte, Argopecten purpuratus, por medio de shock térmico. Tesis del Instituto de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile (UACh).

Canello, F., L. Paredes & J. Toro. 1992. Inducción a la triploidía en el ostión del Norte, Argopecten purpuratus, por medio de shock térmico de calor. XII Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen. p. 105.

Cortés, F. 1999. Selección y estimación de heredabilidad en Crassostrea gigas. Tesis para optar al título de Biólogo Marino, Universidad Católica del Norte, p.37.

De la Barra, C. & E. von Brand. 1999. Caracterización cariotípica de Sinum cymba (Mollusca: Mesogastropoda). IV Congreso latinoamericano de malacología (CLAMA), Resumen, 57 pp.

Estévez, B. 1992. Efecto de la autofecundación en el desarrollo temprano de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) (Mollusca : Bivalvia : Pectinidae). Tesis para optar al Grado de Licenciado de Ciencias del Mar, y al Título de Biólogo Marino de la Universidad Católica del Norte (UCN), 50 pp.

Estévez, B. & F. Winkler. 1991. Efecto de la consanguinidad en la supervivencia y el crecimiento de Argopecten purpuratus. XXIV Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Resumen. p. Archivos de Biología y Medicina Experimental 24(4):R- 473.

Estévez, B. & F. Winkler. 1991. Efecto de la consanguinidad sobre la supervivencia y crecimiento larval de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819). IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, COLACMAR. Resumen. p. 139.

Figueroa, E. 1992. Estudio de un polimorfismo de color en la ostra chilena (Tiostrea chilensis, [Ph. 1845] Chanley & Dinamani, 1980). Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias del Mar, y al Título de Biólogo Marino de la Universidad Católica del Norte (UCN), 52 pp.

Figueroa, E. & F. Winkler. 1991. Patrón de herencia de un polimorfismo de color en Tiostrea chilensis. XI Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen. p. 26.

Figueroa, E., E. von Brand & F. Winkler. 1992. Shell color polymorphism and growth in the chilean oyster Tiostrea chilensis. World Aquaculture '92 (E.E.U.U.). Resumen. p. 137.

Frankham, R., Ballou, J. D. & D. A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. 617pp.

Gall, G. A. E. (Chairman, Committee on Aquacultural Genetics and Breeding). 1988. Aquacultural Genetics and Breeding. National Research Priorities, vol. I and II. United States Department of Agriculture (E.E.U.U.). 56 pp. y 61 pp.

Galleguillos, R., E. Tarifeño & R. Guíñez. 1985. Variación y distancia genética entre las poblaciones del bivalvo marino Mesodesma donacium. Informe Final Proyecto DIUC165/84. Biblioteca Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Talcahuano.

Galleguillos, R. & L. Troncoso. 1990. Variación proteínica en el ostión del Norte, Argopecten purpuratus, y el choro Choromytilus chorus. En: "Cultivo de Moluscos en América Latina", Memorias de la 2ª Reunión Grupo de Trabajo Técnico, Ancud - Chiloé, Chile 1989, CIID / Canadá. Publicado en Bogotá, Colombia 1990.

Galleguillos, R. & L. Troncoso. 1991. Protein Variation in the Chilean - Peruvian Scallop Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819). En: "An International Compendium of Scallop Biology and Culture". Shumway, S. E. & P.A. Sandifer (ed.) , publicado por The World Aquaculture Society.p. 146-150.

Galleguillos, R., L. Troncoso, M. Astorga & J. Monsalves. 1990. Una revisión del problema de heterocigosidad y crecimiento en bivalvos. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Resumen. p. 40.

Garrido, J. 1990. Tasas de crecimiento y mortalidad de dos morfos de color encontrados en el ostión del Norte, Argopecten purpuratus (Mollusca : Bivalvia: Pectinidae), y la composición fenotípica de su descendencia. Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias del Mar, y al Título de Biólogo Marino de la Universidad Católica del Norte (UCN), 61 pp.

Godoy, M., 1998. Comparación cariotípica de los nudibranquios Phidiana lottini y Anisodoris rudberghi. Tesis para optar al título de Biólogo Marino, Universidad Católica del Norte, 47 pp.

Godoy, M.I., E. von Brand & C. Palma-Rojas. 1997. Karyotype of the nudibranch Phidiana inca (Mollusca . Opisthobranchia). The Veliger, 40 (1) : 43 - 46.

Godoy, M., E. von Brand & C. Palma Cariotipo del nudibranquio Phidiana inca (Mollusca : Opistobranchia). 11º Congreso Latinoamericano de Genética, Pto. Vallarta Mexico, 1994. Resumen, 331.

Guerra, R. & B. Campos. 1991. Caracterización del número cromosómico de Semele solida (Mollusca : Bivalvia). IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, COLACMAR. Resumen p.138.

González, M., J. Godoy & N. Inestroza. 1991. DNA mitocondrial de Concholepas concholepas. Resumen. p. 139.

Guíñez, R. 1989. Mejoramiento Genético en Recursos Marinos: Situación Actual y Perspectivas. Investigación Pesquera (Chile), 35:113-121.

Guíñez, R. 1989. Estudios Genético - Ecológicos en la ostra chilena, Tiostrea chilensis. En: "Genética y Recursos Naturales". F. Alay (ed.), Publicaciones de la Universidad de Concepción, 34 - 38.

Guíñez, R. 1991. Plan Nacional de Mejoramiento Genético, Instituto de Fomento Pesquero, IFOP. Documento de Circulación Restringida. 81 pp.

Guíñez, R. 1993. Investigación Repoblamiento Recursos Bentónicos, Area Piloto IV Región. Etapa V. Selección Genética de Tiostrea chilensis: Evaluación de Planes de Mejoramiento Genético para la ostra chilena. Corporación de Fomento a la Producción CORFO, Ministerio de Economía (Chile). AP 93 (en prensa).

Guíñez, R. & B. Contreras. 1993. Growth rate, Heterozygosity and Oxygen consumption in the chilean oyster, Tiostrea chilensis (submitted).

Guíñez, R. & R. Galleguillos. 1985. Clinal Variation in Morphological Distance between Genotypes at the Carbonic Anhydrase Locus in the Chilean Oyster, Tiostrea chilensis (Philippi, 1845), Chanley & Dinamani, 1980. Revista Brasileira de Genetica, VIII, 3:609 - 616.

Guíñez, R. & R. Galleguillos. 1986. Heterocigosidad Genética, Crecimiento y Sobrevivencia Relativa en Cohortes de Tiostrea chilensis. Informe Final Proyecto 2F/84. Biblioteca de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Talcahuano).

Guíñez, R. & R. Galleguillos. 1986. Variaciones de la Heterocigosidad en el locus CA entre Clases de Tamaño en Poblaciones de la Ostra Chilena Tiostrea chilensis (Philippi, 1845), Chanley & Dinamani, 1980. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción 57:63-68.

Guíñez, R., M. V. Gómez & J. C. Castilla. 1992. Diferenciación genética poblacional de Concholepas concholepas Brugière, 1789 (Gastropoda : Muricidae) en su área de distribución Centro - Norte. Biología Pesquera (Chile) 21:31-42.

Guíñez, R., A. Monsalve & R. Galleguillos. 1986. Correlaciones Genético-Morfológicas en la ostra chilena, Tiostrea chilensis (Philippi, 1845), Chanley & Dinamani, 1980, del Banco de Pullinque (Ancud, Chiloé). Biología Pesquera 15:17-25.

Guíñez, R., E. Olavarría, A. Paredes & E. Bustos. 1992. Investigación Repoblamiento Recursos Bentónicos, Area Piloto IV Región. Etapa IV. 4. Selección Fenotípica, interacciones genotipo - ambientales y estimación de parámetros genéticos de la tasa de crecimiento en ostra chilena Tiostrea chilensis. Corporación de Fomento de la Producción, CORFO, Ministerio de Economía de Chile, AP 92/2 b. (en prensa).

Guíñez, R., A. Paredes, E. Olavarría, J. Valencia & J. García. 1991. Investigación Repoblamiento Recursos Bentónicos, Area Piloto IV Región. Etapa III. 3. Investigaciones Genéticas en ostra, Tiostrea chilensis (Philippi, 1845). Corporación de Fomento de la Producción, CORFO, Ministerio de Economía de Chile. SGI - IFOP 91/5:37-60.

Jollán, L. 1993. Estudio de diferencias genéticas en caracteres cuantitativos entre cuatro poblaciones alopátricas de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) (Mollusca : Bivalvia : Pectinidae). Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias del Mar, y al Título de Biólogo Marino de la Universidad Católica del Norte. 89 pp.

Jollán, L. & F. Winkler. 1991. Comparación de la supervivencia y crecimiento entre 4 poblaciones de Argopecten purpuratus. IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, COLACMAR. Resumen, p. 138.

Jollán, L., E. von Brand & F. Winkler. 1994. Comparison of Allopatric Scallop Populations in northern Chile. 5th International Symposium on Genetics in Aquaculture, Halifax - Canada. Resumen, p. 75.

Kijima, A., Mori, K., Y. Fujio. 1984. Population differences in gene frequency of the japanese scallop Patinopecten yessoensis on the Okhotsk Sea Coast of Hokkaido. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 50(2): 241-248.

Ladrón de Guevara, B. 1991. Descripción Cariotípica de Tiostrea chilensis y Cariología Comparada de Especies de la Subfamilia Ostreinae. Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias del Mar, y al Título de Biólogo Marino de la Universidad Católica del Norte (UCN), 52 pp.

Ladrón de Guevara, B., B. Estévez, L. Jollán, F. Winkler & E. von Brand. 1992. Evidencia cromosómica de la inducción química a triploidía en Argopecten purpuratus. XII Jornadas de Ciencias del Mar, Resumen p. 71.

Ladrón de Guevara, B., C. Palma, F. Rodríguez - Romero, E. von Brand & F. Winkler. 1992. Comparative karyology of four amaerican oyster species. Symposium on Genetics & Evolution of Aquatic Organisms, Bangor - Wales, Gran Bretaña, Resumen p. 32.

Ladrón de Guevara, B., F. Winkler & C. Palma. 1994. Karyotype description and the position of the nucleolar organizer region (NOR) in the chilean oyster Tiostrea chilensis (Philippi), Chanley & Dinamani. En: "Genetics & Evolution in Aquatic Organisms". A.R. Beaumont (ed), Chapman and Hall Publ., 399 - 405.

Mettifogo, L., L. Jollán, F. Winkler & G. Martínez. 1992. Composición bioquímica de progenies de cuatro poblaciones de Argopecten purpuratus. XII Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen p. 120.

Monsalves, J. 1990. Relación heterocigosidad individual y fenotipo en una cohorte transplantada de Argopecten purpuratus. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Resumen, p. 28.

Palma - Rojas, C., R. Guerra, D. Brown & E. von Brand. 1997. Quantitative Karyotype of Choromytilus chorus (Mollusca: Bivalvia : Mytilidae). The Veliger, 40 (3) : 259 - 262.

Palma - Rojas, C., E. von Brand & M.I.Godoy. 1997. Citogenética comparada de los nudibranquios Phidiana lottini y Anisodoris rudberghi (Mollusca : Opisthobranchia). XXX Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, Puerto Varas - Chile, Resumen.

Paredes, L., F. Canello & J. Toro. 1991. Interacción genotipo - ambiente en cultivo de laboratorio de Mytilus chilensis bajo 3 diferentes concentraciones de

microalgas. IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, COLACMAR. Resumen, p. 137.

Riquelme, R. A., E. von Brand & K. Lohrmann. 1998. Validación de la medición de diámetro de núcleo para la determinación de niveles de ploidía en Argopecten purpuratus (Mollusca : Bivalvia). XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, La Serena – Chile. Resumen, p. 80.

Riquelme, R. 1999. Determinación de niveles de ploidía en Argopecten purpuratus mediante la medición del diámetro nuclear como método alternativo al conteo cromosómico. Tesis para optar al título de Biólogo Marino, Universidad Católica del Norte, 60 pp.

Smith, P. J. 1994. Genetic diversity of marine fisheries resources. Possible impacts of fishing. FAO. Fisheries Technical Paper. 344.

Sokal, R. & F. Rholf, 1981. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd ed. W. H. Freeman & Company, San Francisco.

Tapia, M.S. 1998. Producción de organismos triploides de ostra japonesa Crassostrea gigas. Tesis para optar al Título de Ingeniero pesquero, Universidad Católica de Valparaíso, 48 pp.

Toro, J. 1991. Respuesta a la selección y estima de heredabilidad realizada para el carácter longitud de valva en la ostra chilena Ostrea chilensis. Revista de Biología Marina (Valparaíso) 26(2):267 -280.

Toro, J. 1992. Response to artificial selection and realized heritability estimation for shell height in the Chilean Oyster Ostrea chilensis, Philippi, 1845. World Aquaculture '92, E.E.U.U. Resumen p. 414.

Toro, J. & G. Newkirk. 1990. Phenotypic Analysis in the chilean oyster, Ostrea chilensis, Philippi, 1845: relationship between juvenile and adult growth rates. Aquaculture and Fisheries Management 21:285-291.

Toro, J. & G. Newkirk. 1991. Response to artificial selection and realized heritability estimate for shell height in the Chilean oyster, Ostrea chilensis. Aquatic Living Resources 4:101-108.

Troncoso, L. & R. Galleguillos. 1989. Variación genética en Choromytilus chorus (Molina, 1782). IX Congreso Latinoamericano de Genética, Lima - Perú. Resumen p. 153.

Troncoso, L. & R. Galleguillos. Correlación entre loci enzimáticos y talla en una cohorte de Choromytilus chorus. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Resumen, p. 34.

Vergara, A. M., J. E. Toro & K. A. Paschke. 1992. Relaciones entre variables fisiológicas, heterocigosidad individual y eficiencia de crecimiento. XII Jornadas de Ciencias del Mar,. Resumen, p. 130.

Volckaert. F. & E. Zouros. 1989. Allozyme and physiological variation in the scallop Placopecten magellanicus and the general model of the effects of the heterozygosity on fitness in marine molluscs. Marine Biology. 103: 51- 61.

von Brand, E. 1988. Aspectos Genéticos Básicos del Molusco Bivalvo Argopecten purpuratus. XXI Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Resumen, p. 48.

von Brand, E. 1991. Genetic Aspects of Cultured Scallop Populations. Tesis para optar al Grado de Doctor en Agricultura de la Universidad de Tohoku, Sendai - Japón. 111 pp.

von Brand, E. 1993. Advances in Genetics of the Chilean Scallop Argopecten purpuratus. II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Guayaquil - Ecuador. Resumen, p.13.

von Brand, E. 1996. Presente y Futuro de la Genética Aplicada al Cultivo de Moluscos. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Coquimbo - Chile, Resumen, p. 206.

von Brand, E. 1996. Estudios genéticos del ostión del norte Argopecten purpuratus y su aplicación a la Acuicultura. En: Taller "Avances y prespectivas del cultivo del ostión". IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Coquimbo - Chile, Resumen, p. 211.

von Brand, E. 1996. Genetics Applied to Mollusc Culture and Disease Control. Proceedings of the 4th International Congress on Medical and Applied

Malacology (ICMM), Santiago - Chile, Resumen, J. Med. & Appl. Malacol., 8 (1) : 37.

von Brand, E. 1999. Uso de la Genética en Taxonomía de moluscos. Conferencia Invitada. IV Congreso Latinoamericano de Malacología (IV CLAMA), Coquimbo – Chile.

von Brand, E. 2001. "Organismos Genéticamente Modificados. Definición y su aplicación a cultivos bentónicos". 2001. Presentado en el Simposio: Perspectivas de Cultivo de Organismos Bentónicos. XX Congreso de Ciencias del Mar, Viña del Mar, Chile. Resumen, p.129.

von Brand, E. & C. Cárcamo 1994. Análisis electroforético de cuatro poblaciones alopátricas del pectínido Argopecten purpuratus del Norte de Chile. 11º Congreso Latinoamericano de Genética, Puerto Vallarta, México. Resumen nº 371.

von Brand, E. & M.I. Godoy. 1998. Consideraciones para la masificación de la inducción a triploidía de Argopecten purpuratus. XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, La Serena, Chile. Resumen, p. 79.

von Brand, E. & A. Kijima. 1990. Comparison of genetic markers between the chilean scallop, Argopecten purpuratus, and the japanese scallop, Patinopecten yessoensis. Tohoku Journal of Agricultural Research, 41(1-2):25-35.

von Brand, E. & G. Merino. 1997. Culture of marine invertebrates of commercial importance. International Workshop: Cryopreservation, Reproduction and Genome Conservation. Viña del Mar – Chile. Resumen, p. 38 – 39.

von Brand, E., G. Bellolio & K. Lohrmann. 1987. Técnica para la preparación de cromosomas del ostión del Norte (Argopecten purpuratus). VII Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen, p. 154.

von Brand, E., G. Bellolio & K. Lohrmann. 1990. Chromosome Number of the Chilean Scallop Argopecten purpuratus. Tohoku Journal of Agricultural Research, 40(3-4):91-95.

von Brand, E., J. Garrido & L. Jollán. 1988. Polimorfismo del color valvar de Argopecten purpuratus. VIII Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen, p.

von Brand, E., M.I.Godoy & C. Palma-Rojas. 1996. Karyotype of the nudibranch Anisodoris rudberghi (Mollusca: Opisthobranchia). 4th International Congress on Medical and Applied Malacology (ICMM), Santiago - Chile, Resumen, J.Med. & Appl. Malacol., 8 (1) : 171.

von Band, E. y A. Kijima. 1990. Comparison of genetic markers between the chilean scallop Argopecten purpuratus and the japanese scallop Patinopecten yessoensis. Tohoku Journal og Agricultural Research. 41(1- 2): 25- 35.

von Brand, E., R.A.Riquelme & K. Lohrmann. 1999. Preliminary description of hemocytes of the northern chilean scallop Argopecten purpuratus. 12th International Pectinid Workshop, Bergen – Noruega. Resumen.

von Brand, E., A. Bodini, G.E. Merino & G. Bordagaray. 1998. Triploid induction in Argopecten purpuratus using cytochalasin –B and 6 – DMAP. Aquaculture ’98, Las Vegas – USA. Resumen, p. 65.

von Brand, E., G. Merino, G. Bordagaray & A. Abarca. 1997. Different Bottlenecks detected in triploid induction trials on mass scale culture of the chilean scallop Argopecten purpuratus. 11th International Pectinid Workshop, La Paz, B.C.S. - Mexico, Resumen, p.162 - 163.

von Brand, E., M. Wolff, F. Winkler, B. Ladrón de Guevara, B. Estévez, L. Jollán & J. Garrido. 1992. Aspectos genéticos del crecimiento y desarrollo del ostión del norte Argopecten purpuratus. Informe Final Proyecto DGI/UCN. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte (Coquimbo),19 pp.

Winkler, F. 1992. Selección temprana en semillas de Argopecten purpuratus (Mollusca : Bivalvia :Pectinidae): ¿ Un reflejo de nuestro esfuerzo o sólo un espejismo ? VII Simposio Latinoamericano de Acuicultura. Barquisimeto - Venezuela. Resumen, p. 54.

Winkler, F., B. Estévez & L. Jollán. 1993. Cultivo de semillas de Argopecten purpuratus en ambiente controlado. XIII Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen, p.

Winkler, F., B. Estévez, E. von Brand & L. Jollán. 1992. Polimorfismo del color de la concha de Argopecten purpuratus: descripción y posible base hereditaria. XII Jornadas de Ciencias del Mar. Resumen, p. 131.

Winkler, F. & E. von Brand. 1991. Avances en Genética del Ostión, Argopecten purpuratus. IVCongreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, COLACMAR. Resumen, p. 64.

Winkler, F., B. Ladrón de Guevara, B. Estévez & L. Jollán. 1993. Inducción a triploidía en Argopecten purpuratus Lamarck, 1819, mediante citocalasina - B. Revista de Biología Marina (Valparaíso) 28(2).

Wolff, M & J. Garrido. 1991. Comparative Study on Growth and Survival of two color morphs of the Chilean scallop (Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819)) in suspended culture. Journal of Shellfish Research, 10(1):47-53.

Wolff, M & E. von Brand. 1988. Mejoramiento del crecimiento del ostión del norte (Argopecten purpuratus) por inducción de esterilidad. Informe Proyecto Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte (Coquimbo). 12 pp.

Wolff, M., E. von Brand & L. Jollán. 1991. Temperature Shock Treatment for Early Larval Selection in the Chilean scallop Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819). En: "An International Compendium of Scallop Biology and Culture". Shumway, S.E. & P.A. Sandifer (ed). Publicado por The World Aquaculture Association, pp. 10 - 15.

4.3. Literatura consultada Tema Transporte

OIE, Office International des Epizooties, 2001. Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. OIE, Paris, 101 pp.

4.4. Literatura consultada Tema Liberación

André, C., P. Johnson & M. Lindegarth. 1993. Predation on settling bivalve larvae by benthic suspension feeders: the role of hydrodynamics and larval behaviour. Mar. Ecol. Prog. Ser., 97: 183-192.

Ansell, A.D., P.R.Barnett, A. Bodoy, and H. Massé (1980) Upper temperature tolerances of some European Molluscs II. *Donax vittatus*, *D. semistriatus*, *D. trunculus*. Marine Biology 58: 41 – 46

Arnold, W. S. 2001. Bivalve enhancement and restoration strategies in Florida, U.S.A. Hydrobiologia, 465: 7-19.

Arntz, W. E. Valdivia (1985) Incidencia del fenómeno "El Niño" sobre los mariscos en el litoral peruano : (91 – 101), En: El Niño su impacto en la fauna marina. Instituto del mar del Perú, Volumen extraordinario, 222 pp.

Arsenault, D. J. & J. H. Himmelman. 1996. Size-related changes in vulnerability to predators and spatial refuge use by juvenile Iceland scallop *Chlamys islandica*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 140: 115-122.

Barbeau, M. A., B. G. Hatcher, R. E. Scheibling, A. W. Hennigar, L. H. Taylor & A. C. Risk. 1996. Dynamics of juvenile sea scallops (*Placopecten magellanicus*) and their predators in bottom seeding trials in Lunenburg Bay, Nova Scotia. Can. J. Fisheries & Aquat. Sci., 53:2494-2512.

Bartol, I. K. & R. Mann. 1997. Amall-scale settlement patterns of the oyster Crassostrea virginica on a constructed intertidal reef. Bull. Mar. Sci., 61: 881-897.

Boot, G. 2003. Catch per Unit Effort: an index for *Mesodesma donacium* abundance (Picture of "macheros" coming). Tesis, Rijksuniversiteit Groningen, Holland

Castell, L. L. 1997. Population studies of juvenile *Trochus niloticus* on a reef flat on the north-eastern Queensland coast, Australia. Mar. Freshwater Res., 48: 211-217.

Crowe, T. P., G. Dobson & C. L. Lee. 2001. A novel method for tagging animals in complex habitats and its use in research into stocks enhancement of *Trochus niloticus*. Aquaculture, 194: 383-391.

Crowe, T. P., Ch. L. Lee, K. A. McGuinness, M. J. Makatipu, J. Manuputty, F. N'guyen, K. Pakoa & J. Tetelepta. 2002. Experimental evaluation of the use of hatchery-reared juveniles to enhance stocks of the topshell *Trochus niloticus* in Austria, Indonesia and Vanuatu. Aquaculture, 206: 175-197.

Defeo, O., C. Layerle, A. Masello. (1986) Spatial and temporal structure of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854) in Uruguay. Medio Ambiente 8(1): 48 – 57.

Eggleston, D. B. & D. A. Armstrong. 1995. Pre- and postsettlement determinants of estuarine dungeness crab recruitment. Ecol. Monogr., 65: 193-216.

Filun, L. (1992) Ecologia reproductiva de Mesodesma donacium (Lamarck, 1818) (Bivalvia: Mesodesmatidae), en la playa de Mehuin, Provincia de Valdivia. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Zoologia, 41 pp.

Frischer, M. E., J. M. Danforth, L. C. Tyner, J. R. Leverone, D. C. Marelli, W. S. Arnold & N. J. Blake. 2000. Development of an *Argopecten*-specific 18S rRNA targeted generic probe. Mar. Biotechnol., 2: 11-20.

Gosselin, L. A. & P. Y. Qian. 1997. Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser., 146: 265-282.

Hilborn, R. 1998. The economic performance of marine stock enhancement projects Bull. Mar. Sci. 62: 661-674.

Hoefel, F & S. Reniers. 2003. Wave-induced sediment transport and sandbar migration. Science, 299: 1885-1887.

Hunt, H. L. & R. E. Scheibling. 1997. Role of early postsettlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser., 155: 269-301.

Jaramillo, E., M. Pino, L. Filun, M. González. (1994) Longshore distribution of *Mesodesma donacium* (Bivalvia: Mesodesmatidae) on a Sandy Beach of the South of Chile. The Veliger 37 (2): 192 – 200.

Lenihan, H. S. & F. Micheli. 2000. Biological effects of shellfish harvesting on oyster reefs: Resolving a fishery conflict using ecological experimentation. Fishery Bull., 98: 86-95.

Lenihan, H. S. & F. Micheli. 2001. Soft-Sediment Communities. in: Bertness, M. D., S. D. Gaines & M. E. Hay, Marine Community Ecology. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Levitan, D. R. 1991. Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. Biol. Bull., 181: 261-268.

Levitan, D. R., M. A. Sewell & Fu-Shiang Chia. 1992. How distribution and abundance influence fertilization success in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. Ecology, 73: 248-254.

MacFarlane, S. L. 1998. The evolution of a municipa quahog (hardclam), Mercenaria mercenaria management program, a 20-year history: 1975-1995.

McLachalan A. (1996) Physical factors in benthic ecology: effects of changing sand particule size on beach fauna. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 131: 205 – 217

Mann, R. 200. Restoring the oyster reef communities in the Chesapeake Bay: A commentary. J. Shellfish Res., 19: 335-339.

McShane, P. E. 1991. Density-dependent mortality of recruits of abalone Haliotis rubra (Mollusca: Gastropoda). Mar. Biol., 110: 385-389.

Miranda, C. (2001) La desaparición del banco de machas *Mesodesma donacium* (Lamark, 1818) (Mollusca: Bivalvia) en la bahía de Coquimbo IV Región de Chile: sus probables causas. Tesis para optar al titulo de Biólogo Marino. Universidad Católica del Norte

O'Beirn, F. X., M. W. Luckenbach, J. A. Nestlerode & G. M. Coates. 2000. Toward design criteria in constructed oyster reefs: Oyster recruitment as a function of substrate type and tidal height. J. Shellfish Res., 19: 387-395.

Olafsson, E. B., C. H. Peterson & W. G. Ambrose. 1994. Does recruitment limitation structure populations and communities of macro-invertebrates in marine soft sediments: the relative significance of pre- and postsettlement processes. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 32: 65-109.

Olivares, C., D. A. Lancellotti & W. B. Stotz. 2002. Asociación entre *Polydora bioccipitalis* (Polychaeta: Spionidae) y *Mesodesma donacium* (Bivalvia: Mesodesmatidae) en Bahía Tongoy, IV Región. XXII Congreso de Ciencias del Mar, Universidad Austral de Chile, 28-31 Mayo, Valdivia 106p.

Ortiz, M., W. Stotz (1996) Distribución de juveniles recientemente asentados de *Mesodesma donacium* (Lamark, 1818)(Mollusca: Bivalvia: Mesodesmatidae)

en tres bahías de la cuarta región: variables físicas y químicas que le caracterizan. Biología Pesquera 25: 27 – 40.

Osman, R. W. & R. B. Whitlatch. 1995. Predation on early ontogenetic life stages and its effect on recruitment into a marine epifaunal community. Mar. Ecol. Prog. Ser., 117: 111-126.

Peterson, C. H., H. C. Summerson & J. Huber. 1995. Replenishment of hard clam stocks using hatchery seed: combined importance of bottom type, seed size, planting season, and density. J. Shellfish Res., 14: 293-300.

Ray, M. A. W. Stoner & S. M. O'Connell. 1994. Size-specific predation of juvenile of queen conch *Strombus gigas*: Implications for stock enhancement. Aquaculture, 128: 79-88.

Schiel, D. R. 1993. Experimental evaluation of commercial-scale enhancement of abalone Haliotis iris populations in New Zealand. Mar. Ecol. Prog. Ser., 97: 167-181.

Southworth, M. & R. Mann. 1998. Oyster reef broodstock enhancement in the Great Wicomico River, Virginia. J. Shellfish Res., 17: 1101-1114.

Stive, M. & A. Reiniers. 2003. Sandbars in motion. Science, 299: 1855-1856.

Stoner, A. W. & M. Davis. 1994. Experimental outplanting of juvenile queen conch, *Strombus gigas*: comparison of wild and hatchery-reared stock. Fish. Bull., 92: 390-411.

Stoner, A. W., N. Mehta & M. Ray-Culp. 1998a. Mesoscale distribution patterns of queen conch (*Strombus gigas* Linne) in Exuma Soud, Bahamas: Link in recruitment from larvae to fishery yields. J. Shellfish Res., 17: 955-969.

Stoner, A. W., M. Ray-Culp & S. M. O'Connell. 1998b. Settlement and recruitment of queen conch (*Strombus gigas*) in seagrass meadows: associations with habitat and micropredators. Fish. Bull., 96: 885-899.

Stoner, A. W. & M. Ray. 1993. Aggregation dynamics in juvenile queen conch (*Strombus gigas*): population structure, mortality, growth, and migration. Mar. Biol., 116: 571-582.

Stotz, W. B. 2002. Why Restoration or Enhancement?: Growing Needs for Invertebrate Fisheries in Chile. Disertación. International Workshop,

Restoration of Benthic Invertebrate Populations: Genetics, Diseases & Ecology. Coquimbo, Chile.

Stotz, W. B, J. Aburto & D. A. Lancellotti. 2002. Primer Informe Seguimiento Área de Manejo, Peñuelas A. Informe. Universidad Católica del Norte, 57 pp.

Tarifeño, E. 1980. Studies on the biology of the surf clam Mesodesma donacium (Lamarck, 1818) (Bivalvia: Mesodesmatidae) from Chilean sandy beaches. PhD. Tesis, University of California, Los Angeles.

Wahle, R. A. & L. S. Incze. 1997. Pre- and postsettlement processes in recruitment of the American lobster. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 217: 179-207.

Walton, W.C. & W. Ch. Walton. 2001. Problems, predators, and perception: Management of quahog (Hardclam), *Mercenaria mercenaria*, stock enhancement programs in Southern New England. J. Shellfish Res., 20: 127-134.

Watzin, M. C. 1983. The effects of meiofauna on settling macrofauna: Meifauna may structure macrofaunal communities. Oecologia, 59: 163-166.

TABLAS

Tabla 1.

Prevalencia de Enfermedades chequeadas y organismos Epibiontes registrados en la población donante de *Mesodesma donacium*

Enfermedad/Organismo	Prevalencia (%)
Unicelulares	0
Bonamiosis	0
Enfermedad MSX	0
Enfermedad SSO	0
Marteiliosis	0
Microcitosis	0
Perkinsosis	0
Otros	0
Pluricelulares	
Rhodobothrium mesodesmatum	12,0
Polydora bioccipitalis	16,7
Otros	0

Tabla 2.
Frecuencias alélicas de seis loci polimórficos determinados en cinco poblaciones de *Mesodesma donacium*.

Locus	Alelos	Localidad				
		Hornitos	Tongoy	San Pedro	Nehuentue	Cau- Cau
EST 1	100	1,00	0,89	0,93	1,00	0,98
	45	-	0,11	0,07	-	0,02
PGD	100	0,97	0,92	0,90	0,80	0,77
	68	0,03	0,08	0,10	0,20	0,23
G3PDH	100	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99
	93	-	0,01	-	-	0,01
LLL 1	100	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99
	150	-	-	0,01	-	0,01
LLL 2	100	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99
	118	0,01	0,01	0,01	-	0,01
LGG	100	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00
	83	-	-	0,01	-	-
n		50	50	50	25	50
Prop. loci polimórfcos		0,105	0,210	0,263	0,050	0,263
Heterocigosidad media						
Observada	Ho =	0,04	0,09	0,05	0,16	0,05
Esperada	He =	0,04	0,10	0,08	0,32	0,09
Nº alelos por locus		1,10	1,21	1,21	1,05	1,21

Tabla 3.

Identidad genética en cinco poblaciones de *Mesodesma donacium.*

	Hornitos	San Pedro	Tongoy	Nehuentue	Cau- Cau
Hornitos	-	0,9994	0,9989	0,9984	0,9978
San Pedro		-	1,0000	0,9991	0,9989
Tongoy			-	0,9984	0,9941
Nehuentue				-	0,9945
Cau- Cau					-

Tabla 4,

Distancia genética en cinco poblaciones de *Mesodesma donacium,*

	Hornitos	San Pedro	Tongoy	Nehuentue	Cau- Cau
Hornitos	-				
San Pedro	0,000050	-			
Tongoy	0,001096	0,000046	-		
Nehuentue	0,001522	0,000814	0,001518	-	
Cau- Cau	0,002118	0,001050	0,005835	0,005452	-

Tabla 5.

Numero de machas enterradas a diferentes horas a partir de cuando fueron empacadas

Horas de Empaque

	1		3		6		12		18		24		32	
	A	**J**	**A**	**J**	**A**	**J**	**A**	**J**	**A**	**J**	**A**	**J**	**A**	**J**
1 muestreo	7	7	9	8	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10
2 muestreo	*	*	9	7	10	8	10	10	10	10	10	10	10	10
3 muestreo	*	*	*	*	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10
4 muestreo	*	*	*	*	*	*	9	9	10	10	10	10	10	10
5 muestreo	*	*	*	*	*	*	*	*	10	10	10	10	10	10
6 muestreo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	7	7	10	10
7 muestreo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	10

Tabla 6.

Resultados ANDEVA de tres factores, supervivencia de machas

	df	MS	*F*	Probabilidad	Prueba *a posteriori* (Tukey)
Efecto Principal					
Talla (T)	1	352,1	49,406	2,848E-06***	Grandes > Chicas
Densidad (D)	1	694,9	97,495	3,276E-08***	Llena > Mitad
Temperatura (Tem)	1	1615,8	226,701	7,221E-11***	Sin Hielo > Con Hielo
Interacción					
T x D	1	13,7	1,926	0,184 ns	
T x Tem	1	9,7	1,362	0,260 ns	
D x Tem	1	93,5	13,122	0,002**	
T x D x Tem	1	15,3	2,141	0,163 ns	
Error	16	7,1			

* = P < 0,05

** = P < 0,01

*** = P < 0,001

ns = no significativo (P > 0,05)

Tabla 7.

Resultados ANDEVA de tres factores, tiempo de entierro de machas

	df	MS	*F*	Probabilidad	Prueba *a posteriori* (Tukey)
Efecto Principal					
Talla (T)	2	4087,8	5,714	0,004 **	Mediana = Grande > Chica
Tamaño Grano (TG)	2	106,6	0,149	0,862 ns	
Repetición (R)	2	367,1	0,513	0,599 ns	
Interacción					
T x TG	4	1591,2	2,224	0,067 ns	
T x R	4	283,1	0,396	0,812 ns	
TG x R	4	118,6	0,166	0,956 ns	
T x TG x R	8	282,1	0,394	0,923 ns	
Error	216	715,4			

** = P < 0,01

ns = no significativo (P > 0,05)

Tabla 8.

Condición gonadal de la muestra de machas liberadas en Arica

Sexo	Estado	N
Macho	maduro	1
Macho	semi-desovado	1
Macho	desovado	11
Hembra	semi-desovado	1
Hembra	desovado	18

Tabla 9.

Georeferenciación de las estaciones del monitoreo de Playa Las Machas de Arica, realizado el 29 de Marzo de 2003.

Estación	Latitud	Longitud
1	18º 22` 45,5	70º 21` 04,6
2	18º 22` 55,3	70º 20` 53,8
3	18º 23` 29,4	70º 20` 28,9
4	18º 23` 49,6	70º 20` 14,2
5	18º 24` 07,1	70º 20` 00,5
6	18º 24` 24,8	70º 19` 49,5
7	18º 24` 37,4	70º 19` 39,8
8	18º 24` 50,1	70º 19` 31,0
9	18º 25` 02,1	70º 19` 20,0
10	18º 25` 14,9	70º 19` 08,8
11	18º 25` 27,2	70º 18` 58,3
12	18º 25` 41,0	70º 18` 47,9
13	18º 25` 57,1	70º 18` 57,1
14	18º 26` 10,4	70º 18` 26,7
15	18º 26` 21,8	70º 18` 20,8
16	18º 26` 38,1	70º 18` 15,2
17	18º 26` 54,6	70º 18` 10,1
18	18º 27` 10,4	70º 18` 09,0

Tabla 10.

Georeferenciación de las estaciones del monitoreo de Playa Las Machas de Arica, realizado el 15 de Mayo de 2003.

Estación	Latitud	Longitud
1		
2	18º 21` 38,3	70º 22` 00,1
3	18º 21` 50,4	70º 21` 47,4
4	18º 22` 07,4	70º 21` 32,4
5	18º 22` 22,1	70º 21` 19,6
6	18º 22` 35,8	70º 21` 07,6
7	18º 22` 50,3	70º 20` 55,9
8	18º 23` 05,3	70º 20` 45,8
9	18º 23` 20,3	70º 20` 34,9
10	18º 23` 35,3	70º 20` 23,4
11	18º 23` 50,2	70º 20` 12,4
12	18º 24` 00,4	70º 20` 04,5
13	18º 24`18,3	70º 19` 52,5
14	18º 24` 32,2	70º 19` 42,6
15	18º 24` 44,8	70º 19` 34,1
16	18º 24` 57,1	70º 19` 23,4
17	18º 25` 08,4	70º 19` 14,4
18	18º 25` 21,4	70º 19` 02,8
19	18º 25` 37,7	70º 18` 49,6
20	18º 25` 53,1	70º 18` 37,8
21	18º 26` 07,1	70º 18` 28,2
22	18º 26` 20,9	70º 18` 20,2
23	18º 26` 35,6	70º 18` 15,0
24	18º 26` 54,1	70º 18` 09,5
25	18º 27` 13,5	70º 18` 08,1

Tabla 11.

Georeferenciación de las estaciones del monitoreo en el Sector Peruano, realizado el 16 de Mayo de 2003.

Estación	Latitud	Longitud
1	18º 10` 22,8	70º 39` 23,8
2	18º 10` 56,4	70º 38` 19,5
3	18º 11`27,0	70º 37` 16,7
4	18º 11` 57,8	70º 36` 18,7
5	18º 12` 30,3	70º 35` 20,8
6	18º 13` 03,5	70º 34` 22,7
7	18º 13` 53,3	70º 32` 56,5
8	18º 14` 46,0	70º 31` 28,7
9	18º 15` 39,3	70º 30` 04,2
10	18º 16` 35,4	70º 28` 37,6
11	18º 18` 29,4	70º 25` 53,5
12	18º 19` 26,6	70º 24` 33,5
13	18º 20` 29,6	70º 23` 15,1
14	18º 21` 05,9	70º 22` 32,9

FIGURAS

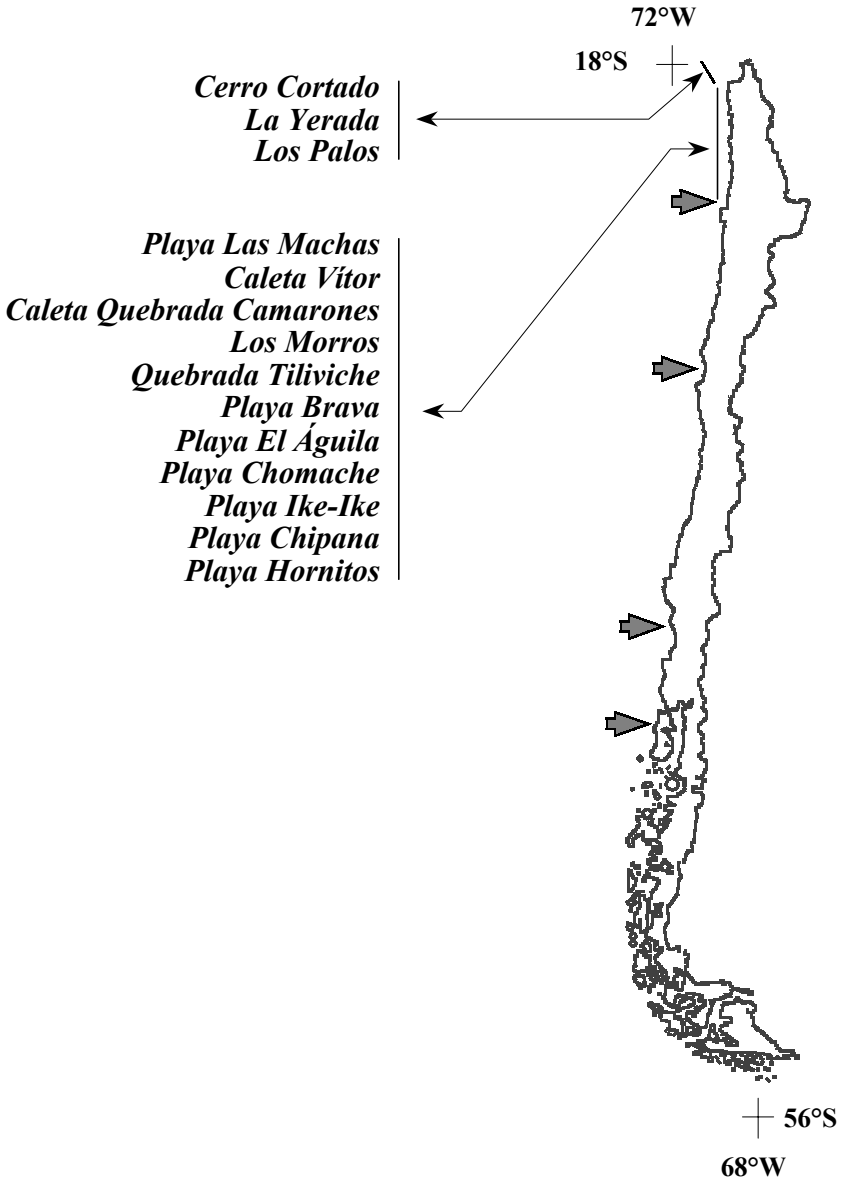


Figura 1.

Mapa de Chile mostrando una representación esquemática
de la distribución geográfica de los sectores visitados.
Flechas indican los lugares de procedencia de las muestras para el estudio genético

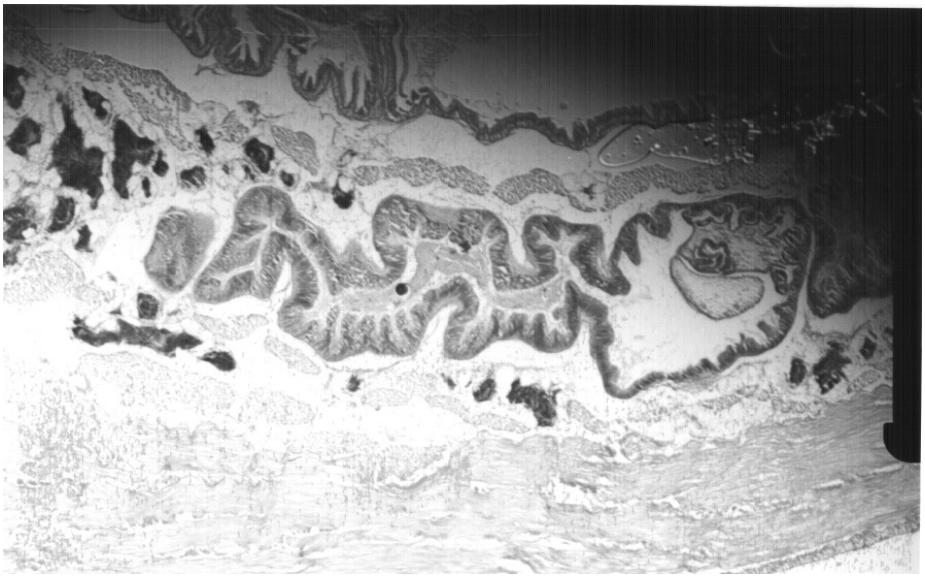


Figura 2.

Corte histológico mostrando al céstodo *Rhodobothrium mesodesmatum* (110X)

Figura 3.

Ubicación, en la cara interna de valva, de la ampolla producida por la presencia de *Polydora bioccipitalis* (tamaño natural)

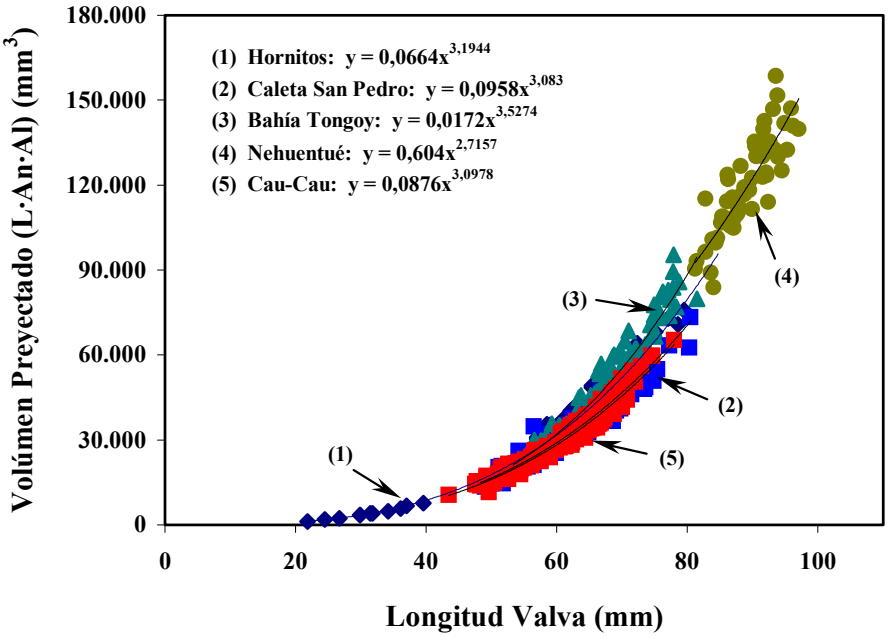


Figura 4.

Volumen proyectado en función de la longitud valvar en 5 poblaciones de machas

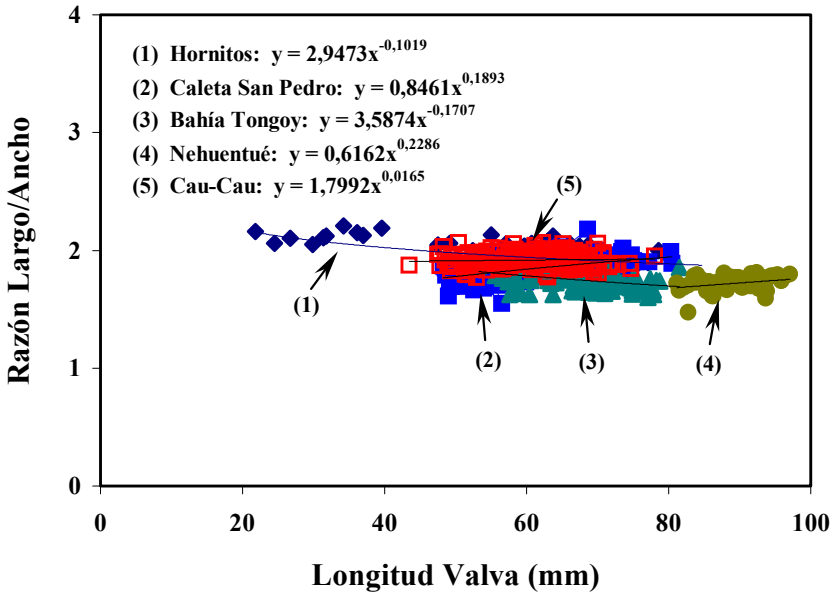


Figura 5.

Razón largo/ancho en función de la longitud valvar en 5 poblaciones de machas

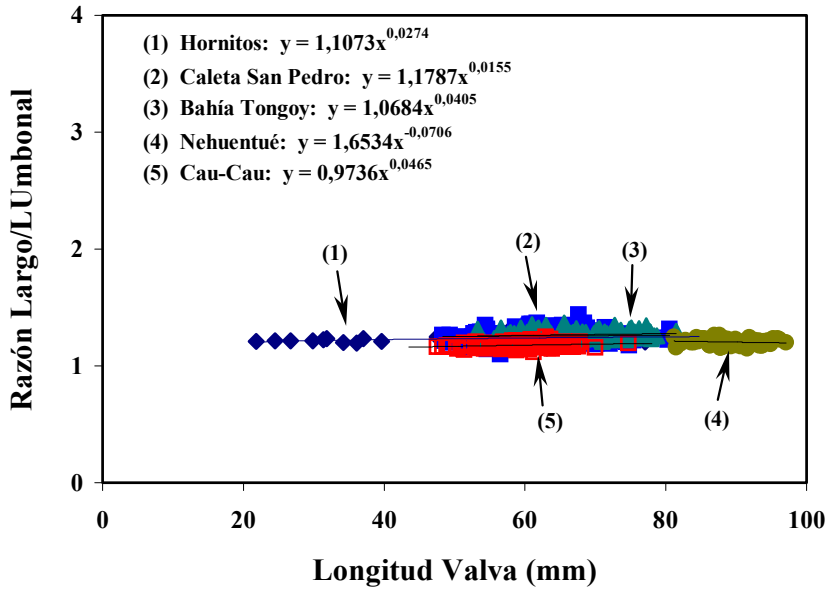


Figura 6.

Razón largo/largo umbonal en función de la longitud valvar en 5 poblaciones de machas

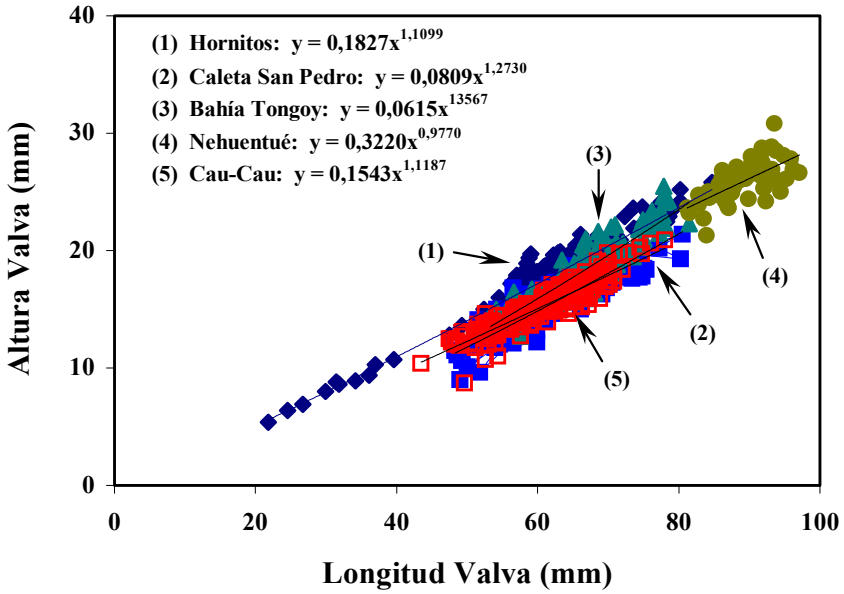


Figura 7.

Alto valvar en función de la longitud en 5 poblaciones de machas

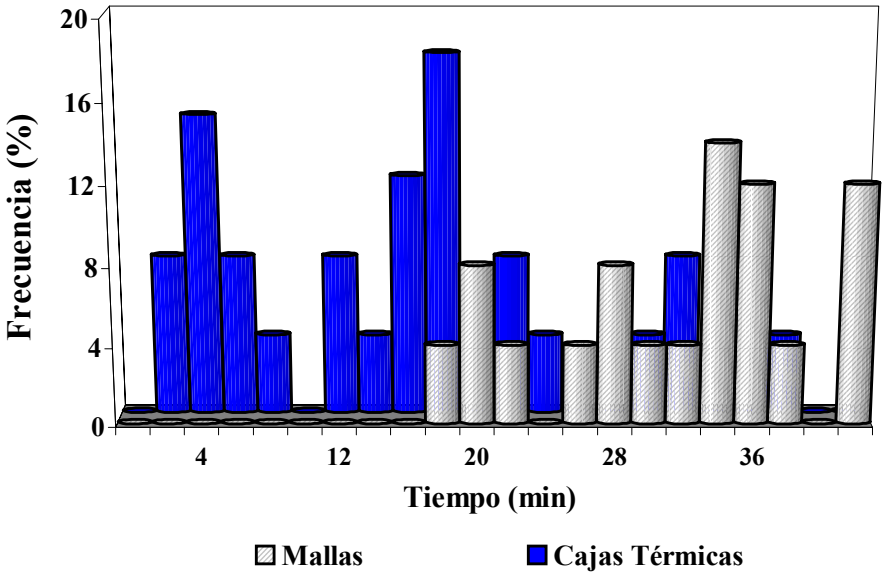


Figura 8.

Frecuencia de machas enterradas luego de ser empacadas por cuatro horas

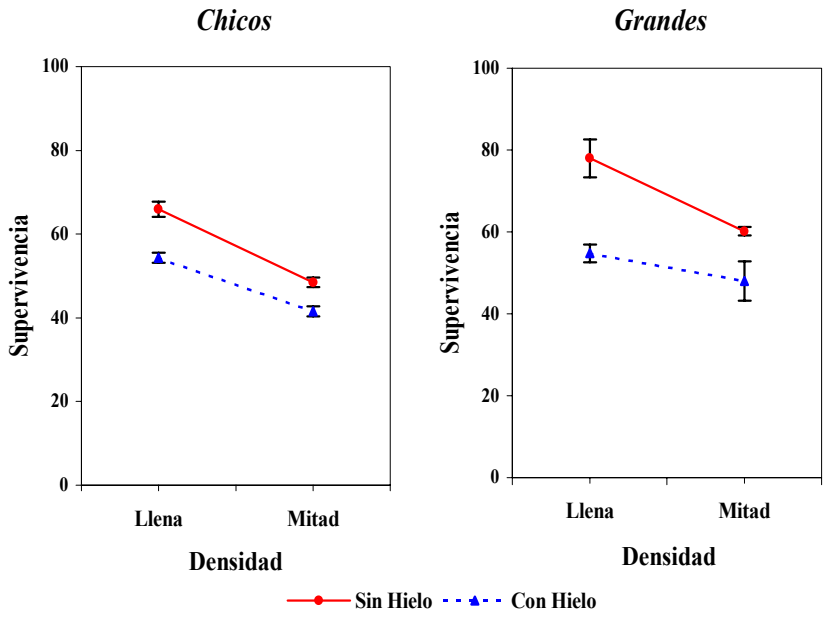


Figura 9.

Supervivencia en machas

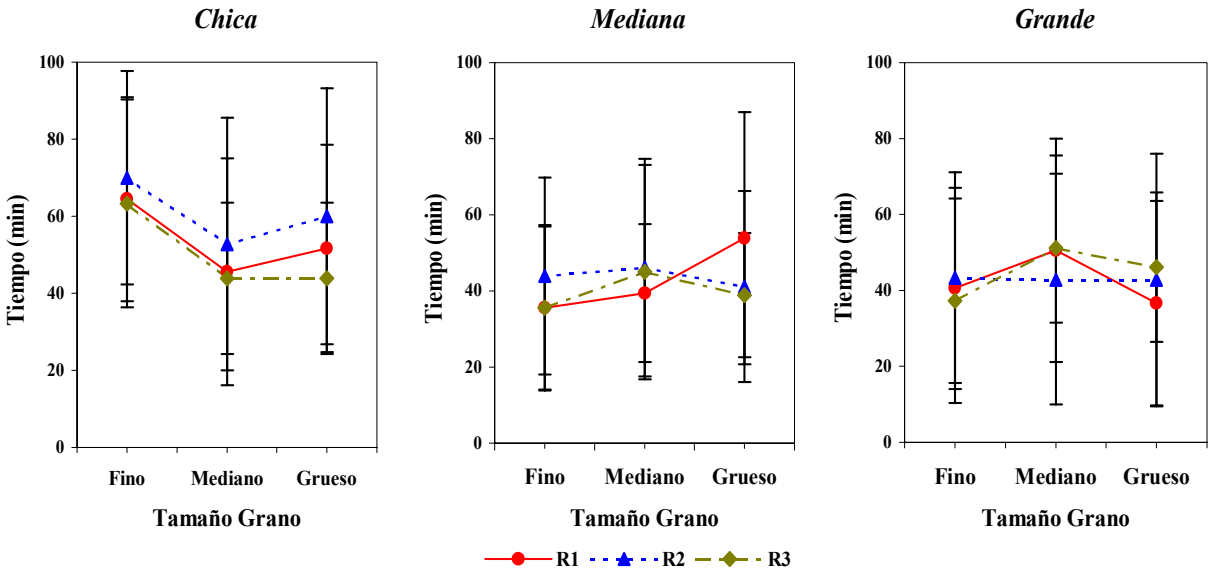


Figura 10.

Velocidad de entierro en machas

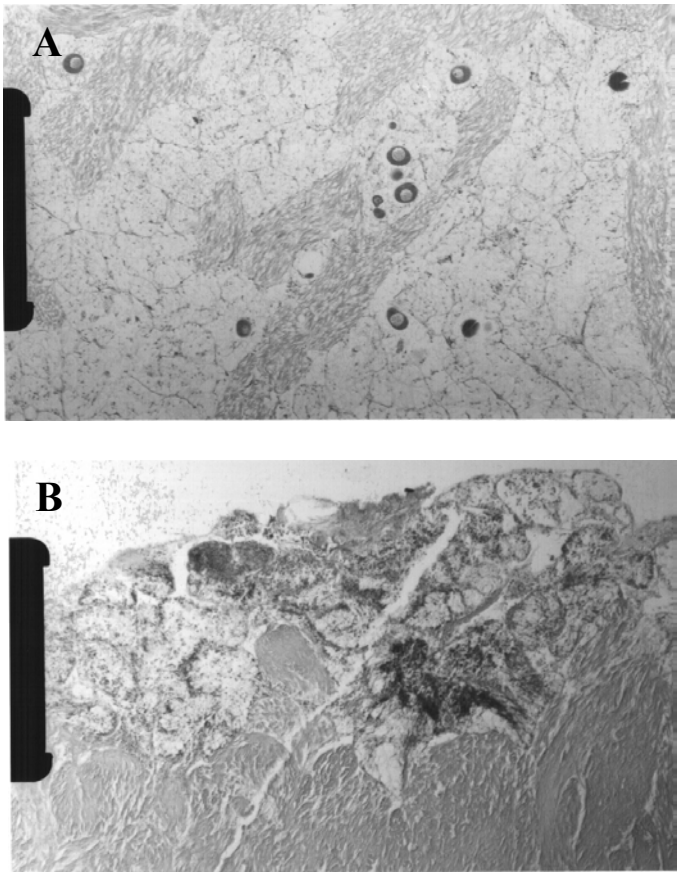


Figura 11.

Corte histológico de gónadas de machas indicando la ocurrencia de desove.
A, gónada femenina; B, gónada masculina

ANEXO I

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

PLAGAS, ENFERMEDADES Y PARÁSITOS

TÍTULO I.1.1.

EPIZOOTIAS CONOCIDAS

La información entregada en este capítulo tiene su origen en los estudios realizados por la comunidad científica y en las recopilaciones realizadas por organizaciones internacionales competentes.

En la organización de la información, cada nivel jerárquico tiene asociado un grado de riesgo, de peligrosidad u otro, asignados en una escala de importancia decreciente con las letras A, B, C, etc. Un valor 0 (cero) indica desconocimiento y no necesariamente ausencia del riesgo

1. Enfermedades de ALTO RIESGO.

Corresponden a las enfermedades conocidas que afectan a organismos bentónicos que forman parte de los recursos hidrobiológicos explotables y/o cultivables, actuales o potenciales de un país. Estas enfermedades han sido reconocidas por la comunidad científica internacional y son de *declaración obligatoria* establecida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Estas no son de cuidado para la salud humana, aunque perjudiciales para la actividad económica. En la mayoría de ellas se desconocen sus efectos sobre la ecología de las poblaciones naturales o de la comunidad de un recurso en cuestión, sin embargo, se estima un efecto potencialmente serio sobre esos niveles de organización.

1.1. MOLUSCOS.

1.1.1. BONAMIOSIS.

Enfermedad provocada por protozoarios del grupo de las Ascetosporas, conociéndose a la fecha las especies *Bonamia exitiosus*, *Bonamia ostreae* y *Bonamia* sp. Este microorganismo ataca los hemocitos de individuos adultos, produciendo mortalidades masivas. Las lesiones pueden ser observadas en los tejidos conectivos de branquias, manto y glándula digestiva, a veces con presencia de abscesos, aunque la apariencia de la mayoría de los individuos que la sufren puede ser normal.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia de *Bonamia* spp. ha sido observada en las especies *Ostrea angasi*, *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*), *Ostrea denselammellosa*, *Ostrea edulis*, *Ostrea puelchana* y *Tiostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*):
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras especies de *Ostrea* y *Tiostrea*, como de otros ostreidos debieran ser consideradas como suceptibles a esta enfermedad:
Categoría de las Especies: Susceptible [B]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [0]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación
Tratamiento: Se desconoce

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Estados Unidos (California, Maine y Washington); (b) Europa, en Dinamarca, España, Francia, Holanda, Irlanda, Italia y Reino Unido; (c) Oceanía, en Australia (Oeste de Australia, Victoria y Tasmania) y Nueva Zelanda.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Elston *et al*. 1986; Bower *et al*. 1994; Elston 1994; Hine 1996; Cochennec *et al*. 1998; O.I.E. 2000; Hine *et al*. 2001).

1.1.2. HAPLOSPORIDIOSIS.

Enfermedad provocada por protistas del grupo de las Ascetosporas, conociéndose a la fecha las especies *Haplosporidium costale* (= *Minchinia costale*), *Haplosporidium nelsoni* (= *Minchinia nelsoni*) y *Haplosporidium* sp. Este microorganismo infecta los hemocitos y los epitelios del tejido conectivo de branquias y manto, principalmente en individuos juveniles, produciéndoles la muerte. Cuando infectados, tanto branquias como manto presentan una decoloración café-rojiza.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia de *Haplosporidium* spp. ha sido observada en las especies *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* y *Pinctada maxima*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La presencia en cualquier especies de bivalvos debieran ser considerada como un riesgo potencialmente serio:
Categoría de Otras Especies: Riesgosa [A]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [B]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Desconocida, posiblemente a través de un huésped intermedio
Tratamiento: Se desconoce

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Estados Unidos (California, Florida, Maine, Massachusetts, Virginia, Washington); (b) Asia, en Korea.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Bower et al. 1994; Elston 1994; Comps and Tigé 1997; Hine 1998; O.I.E. 2000).

1.1.3. MARTEILIOSIS.

Enfermedad provocada por protistas del grupo de las Ascetosporas, conociéndose a la fecha las especies *Marteilia refringens*, *Marteilia sydneyi*, *Marteilia maurini* (?), *Marteilia lengehi* (?) y *Marteilia christenseni* (?). Este microorganismo infecta los epitelios de la glándula y ductos digestivos, del estómago, palpos y en ocasiones en branquias. Cuando infectados, los individuos presentan una pobre condición, gónadas reabsorbidas y una completa desorganización del epitelio de la glándula digestiva, produciendo la muerte por inanición.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia de *Marteilia* spp. ha sido observada en las especies *Argopecten gibbus*, *Cerastoderma* (= Cardium) *edule*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea* angasi, *Ostrea edulis*, *Ostrea puelchana*, *Saccostrea* (= *Crassostrea*) *cucullata*, *Saccostrea echinata*, *Scrobicularia plana*, *Tiostrea chilensis* y *Tridacna maxima*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La presencia en cualquier especie de bivalvo debiera ser considerada como un riesgo potencialmente serio:
Categoría de Otras Especies: Riesgosa [A]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [0]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Posiblemente a través de un huésped intermedio. Se encontró en el copépodo *Paracartia grani*, el que sería el vector intermediario.
Tratamiento: Se desconoce

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Estados Unidos (Florida); (b) Africa, en Marruecos; (c) Asia, en Australia (Nueva Gales del Sur, Queensland, Western Australia); (d) Europa, en España, Francia, Grecia y Portugal.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0].

Referencias: (Bower *et al*. 1994; Elston 1994; O.I.E. 2000; Audemard *et al*. 2002).

1.1.4. MIKROCYTOSIS.

Enfermedad provocada por protistas del grupo de las Ascetosporas, conociéndose sólo dos especies: *Mikrocytos mackini* y *Mikrocytos roughleyi*. Este microorganismo infecta principalmente el tejido conectivo vesicular. Como resultado se produce infiltración de hemocitos y necrosis del tejido, con pústulas, abscesos y úlceras, principalmente en el manto. No siempre las lesiones macroscópicas están presentes.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia de *Mikrocytos* spp. ha sido observada en las especies *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*) y *Saccostrea commercialis*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La presencia en cualquier especie de bivalvo debiera ser considerada como un riesgo potencialmente serio:
Categoría de Otras Especies: Riesgosa [A]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [0]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación [A]

Tratamiento: Probablemente altas temperaturas (>10 ºC) y baja salinidad

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Canadá (Vancouver); (b) Asia, en Australia (Nueva Gales del Sur).
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0].

Referencias: (Bower *et al*. 1994; Elston 1994; O.I.E. 2000).

1.1.5. PERKINSOSIS.

Enfermedad provocada por protozoarios del grupo de las Apicomplexas, conociéndose a la fecha las especies *Perkinsus atlanticus*, *Perkinsus karlssoni*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni* y *Perkinsus qugwadi*. Esta enfermedad ataca tanto a bivalvos como a gastrópodos, ocasionando mortalidades masivas. En bivalvos produce desde un leve debilitamiento de la glándula digestiva y reducción del índice de condición, hasta un severo debilitamiento general, con retracción del manto, inhibición del desarrollo gonadal, disminución del crecimiento y presencia ocasional de abscesos. En gastrópodos produce una disrupción del tejido conectivo y de células epiteliales, con presencia ocasional de abscesos y pústulas en pié y manto. Esto último, cuando el animal sobrevive, causa daño a la comercialización del recurso dado el aspecto producto de las marcas y cicatrices.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia de *Perkinsus* spp. ha sido observada en las especies *Crassostrea virginica*, *Haliotis cyclobates*, *Haliotis laevigata*, *Haliotis ruber*, *Haliotis scalaris* y *Mizuhopecten yessoensis*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La presencia de *Perkinsus* spp. registrada en *Crassostrea gigas* y en un gran número de otros bivalvos no ha resultado ser perjudicial, sin embargo, debieran ser consideradas como un riesgo potencial:
Categoría de Otras Especies: Susceptible [B]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [B]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación [A]
Tratamiento: Probablemente bajas temperaturas (<15 ºC)

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Estados Unidos (Bahía Delaware, Cabo Cod, Florida, Hawaii, Maine, Massachusetts, Nueva Jersey); (b) América del Sur, en Brasil, Venezuela; (c) Centroamérica, en Cuba, México, Puerto Rico; (d) Oceanía, en Australia (Sur del país).
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: Susceptible [B]

Referencias: (Mackin *et al*. 1950; Ray 1952; Lester and Davis 1981; Bower *et al*. 1994; Elston 1994; Goggin and Lester 1995; Blackbourn *et al*. 1998; O.I.E. 2000).

1.2. CRUSTÁCEOS.

1.2.1. ENFERMEDAD DE LA CABEZA AMARILLA.

Enfermedad provocada por un virus relacionado con el grupo de los Coronaviridae, denominado YHV (*Yellowhead virus*). Esta enfermedad ataca principalmente a juveniles tempranos y subadultos de camarones y ha sido detectada en la mayoría de las especies de penaeidos cultivables: produce mortalidades masivas e, incluso, la eliminación completa de las pozas de cultivo. La aparición de la enfermedad se caracteriza por la coloración amarillenta que adquiere el cefalotórax de los animales moribundos, producto de la decoloración del hepatopáncrea, acompañada por un palidecimiento general del cuerpo. Histológicamente, los animales infectados evidencian una necrosis sistémica de los tejidos de origen ecto y endodérmico.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia del TSV ha sido observada principalmente en *Penaeus monodon* y en las especies *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*) y *Penaeus stylirostris*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La enfermedad ha sido establecida como potencialmente letal para la mayoría de las especies de penaeidos cultivables:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [B]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación.
Tratamiento: Se desconoce

La enfermedad ha sido detectada en: (a) Asia, en China, India y Tailandia; (b) Oceanía, en Australia y Filipinas.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: Suseptible [B]

Referencias: (Bower et al. 1994; O.I.E. 2000).

1.2.2. ENFERMEDAD DE LAS MANCHAS BLANCAS.

Enfermedad provocada por un grupo o complejo de especies de virus infecciosos del tipo baculovirus, denominados WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) o WSV (*White Spot Virus*). Esta enfermedad ataca prácticamente a todas las especis de camarones penaeidos cultivables, produciendo mortalidades masivas en un corto lapso de tiempo. La enfermedad se caracteriza por la aparición de puntos o manchas blancas en el epitelio cuticular, las que crecen y coalescen, a veces acompañadas de una coloración corporal rojiza del animal. Los individuos moribundos muestran una destrucción sistémica de los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia del WSSV ha sido observada en las especies cultivables *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*), *Metapenaeus ensis*, *Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon* y *Penaeus stylirostris*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Se ha detectado la presencia del WSSV en poblaciones salvajes de *Paratelphusa hydrodomus* y *Paratelphusa pulvinata* junto a un gran número de especies de crustáceos portadores penaeidos y no-penaeidos e, incluso, en larvas de insectos acuáticos:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Categoría de Otras Especies: Riesgosa [A]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación
Tratamiento: Se desconoce

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Estados Unidos; (b) Asia, en China , India, Japón, Korea y Tailandia .
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Karunasagar *et al*., 1997; O.I.E. 2000).

1.2.3. SÍNDROME DE TAURA.

Enfermedad provocada por un virus del grupo de los Picornaviridae, denominado TSV (*Taura Syndrome Virus*). Esta enfermedad ataca a post-larvas, juveniles y subadultos del camarón blanco del Pacífico, produciendo mortalidades masivas incluso por sobre el 90% de la población cultivada. En una primera fase del desarrollo de la enfermedad (aguda) se ve afectado el epitelio cuticular, con expansión de los cromatóforos rojos que tornan al animal de una coloración rojiza. Además, se observa necrosis focalizada, tubo digestivo vacío y, por lo general, los animales mueren en la siguiente muda. La aparición de lesiones cuticulares melanizadas indica la acción de hemocitos actuando sobre el virus. Finalmente, los que sobreviven la muda pasan a una fase crónica, donde el virus mantiene una persistente infección en el órgano linfoide por lo que los sobrevivientes pueden llevar el virus de por vida. Otros camarones penaeidos pueden desarrollar la enfermedad, pero lo común es la presencia de una persistente infección asintomática. Esta enfermedad también se ha reportado en poblaciones salvajes del camarón blanco del Pacífico.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia del TSV ha sido observada principalmente en la especie *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*), además de *Penaeus schmitti*, *Penaeus setiferus* y *Penaeus stylirostris*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras especies de penaeidos, tales como *Penaeus aztecus*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus japonicus* y *Penaeus monodon* debieran ser consideradas como suceptibles a esta enfermedad:
Categoría de las Especies: Susceptible [B]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [B]
Juveniles: [A]

Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación. No se ha demostrado la transmisión vertical desde reproductores a progenie
Tratamiento: Se desconoce

La enfermedad ha sido detectada en: (a) América del Sur, en Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela; (b) Centroamérica, en México, región del Golfo de México y del Caribe.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Se ha reportado la presencia del TSV en Taipei, China, producto de la importación de *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, no se ha registrado la enfermedad en otras poblaciones de penaeidos cultivados o en estado salvajes fuera del continente Americano.
Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Lightner & Redman, 1998; O.I.E. 2000).

1.2.4. NECROSIS BACULOVIRAL DEL HEPATOPÁNCREAS.

Enfermedad provocada por un virus del tipo baculovirus, denominado BMNV (*Baculoviral midgut gland necrosis virus*). Esta enfermedad ataca a los estados larvales de camarones penaeidos, produciendo mortalidades masivas. El virus se aloja en el hepatopáncreas, produciendo una hipertrofia nuclear y necrosis celular, colapsando finalmente toda la glándula.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia del BMNV ha sido observada en poblaciones salvajes y en cultivo de *Penaeus japonicus* y:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La enfermedad ha sido experimentalmente transmitida a *Penaeus chinensis*, *Penaeus monodon* y *Penaeus semisulcatus*, siendo considerada potencialmente letal para la mayoría de las especies de penaeidos cultivables:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [0]
Juveniles: [0]
Huevos/Larvas: [A]

Modo de Infección: Se transmite mediante ruta oral; el virus se elimina a través de las fecas del animal enfermo.
Tratamiento: Se logra una total o parcial erradicación mediante el lavado de huevos fértiles y nauplios con agua de mar limpia.

La enfermedad ha sido detectada en: (a) Asia, en Japón y Korea; (b) Oceanía (*baculovirus* Tipo C), en Australia, Filipinas e Indonesia.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: Suseptible [B]

Referencias: (Bower et al. 1994; O.I.E. 2000).

1.2.5. POLIHEDROSIS NUCLEAR POR BACULOVIRUS.

Enfermedad provocada por dos virus del tipo baculovirus, conocidos como BP (*Baculovirus penaei*) y MBV (*Penaeus monodon-type baculovirus*). Sin embargo, y de acuerdo con la nomenclatura para virus publicada por la *International Committee on Nomenclature of Viruses* estos son designados como PvSNPV (virus de la polihedrosis nuclear para *Penaeus vannamei*) y PmSNPV (virus de la polihedrosis nuclear para *Penaeus monodon*), respectivamente. Esta enfermedad es potencialmente seria para larvas, post-larvas y estados juveniles tempranos de camarones, produciendo mortalidades masivas. Ambos virus se alojan en las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino medio. Se caracterizan por producir prominentes cuerpos oclusivos intranucleares, denominados cuerpos oclusivos polihédricos.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia del BP ha sido observada en poblaciones salvajes y en cultivo de *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus marginatus* y *Penaeus subtilis*. La presencia del MBV se ha observado principalmente en *Penaeus monodon* pero también en *Metapenaeus bennettae*, *Penaeus indicus* y *Penaeus plebejus*.
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

La enfermedad es considerada potencialmente letal para la mayoría de las especies de penaeidos cultivables:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [0]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [A]

Modo de Infección: Se transmite mediante ruta oral; el virus se elimina a través de las fecas del animal enfermo.
Tratamiento: Se logra la erradicación mediante el lavado de huevos fértiles con agua de mar limpia, iodóforos y formalina.

La enfermedad ha sido detectada en: (a) África; (b) Asia, en Medio Oriente, países del Indo-Pacífico, países del Este y Sur; (c) Norte, Centro y Sur América; (d) Oceanía, en Australia, Tahíti y Hawaii.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: Suceptible [B]

Referencias: (Bower et al. 1994; O.I.E. 2000).

1.2.6. NECROSIS HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA.

Enfermedad provocada por un pequeño virus conocido como IHHNV (*Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus*), clasificado dentro de la familia Parvoviridae. El virus sólo causa

mortalidad masiva a *Penaeus stylirostris*, atacando principalmente los estados de juveniles y subadultos. El virus se aloja en las células de los tejidos de origen ecto y mesodérmico y rara vez en los de origen endodérmico (mucosa epitelial, intestino medio, ciegos pilóricos y hepatopáncreas). En algunas razas de *Penaeus stylirostris* y en *Litopenaeus vannamei* provoca una enfermedad crónica la cual reduce el crecimiento lo que se acompaña con una deformidad cuticular. En esto último, la mortalidad es menor. Cuando sobreviven a la infección del IHHNV los animales llevan el virus de por vida, pasándolo a su progenie y otras poblaciones por transmisión vertical y horizontal.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La presencia del IHHNV ha sido observada en poblaciones salvajes y en cultivo de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

El virus ha sido experimentalmente transmitido a varias otras especies de pennaiedos, sin que se haya desarrollado la enfermedad. Sin embargo, se considera potencialmente patógeno para la mayoría de las especies de penaeidos cultivables:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [B]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [A]

Modo de Infección: Se transmite vertical (progenitor-desendencia) y horizontalmente. El virus se elimina a través de las fecas del animal portador.
Tratamiento: Se logra la erradicación en huevos fértiles y nauplios lavándolos con agua de mar limpia, iodóforos y formalina.

La enfermedad ha sido detectada en: (a) Asia, en Medio Oriente, países del Indo-Pacífico, países del Este y Sur asiático; (b) Centro y Sur América, desde México a Perú; (c) Oceanía, en Guam, Hawaii, Nueva Caledonia y Polinesia Francesa.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: Suceptible [B]

Referencias: (Bower et al. 1994; O.I.E. 2000).

1.2.7. PLAGA DEL CANGREJO DE RÍO.

Enfermedad producida por un hongo del grupo de los Oomycetes, denominado *Aphanomyces astaci*. Este hongo ataca a las especies de cangrejos de río de las familias Astacidae y Cambaridae, no originarias de Norteamérica. Los animales infectados pueden presentar un amplio rango de síntomas, aunque estos pueden estar ausentes. Lo más evidente es la presencia de áreas focales pálidas en la musculatura bajo la delgada cutícula, especialmente en la zona ventral del abdomen y en las articulaciones de los pereiópodos. En el estado terminal de la enfermedad los animales pierden su normal rechazo a la luz brillante, acompañado de una descoordinación de movimientos y pérdida del equilibrio. Aunque el hongo está presente tanto en Norteamérica como en Europa, la enfermedad sólo se ha desarrollado en Europa donde se ha extendido por todo el continente.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La enfermedad ha sido registrada en las especies dulceacuícola *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius pallipes* y *Austropotamobius torrentium*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Las especies norteamericanas *Pacifastacus leniusculus* y *Procambarus clarki* pueden ser portadoras completamente asintomáticas, pero pueden desarrollar la enfermedad y morir bajo condiciones adversas. En forma experimental, el hongo sólo ha podido ser transmitido a la especie *Eriocheir sinensis* y sólo en condiciones de laboratorio:
Categoría de las Especies: Suceptible [B]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: El hongo se transmite por co-habitación, a través de depredadores y mediante implementos contaminados.
Tratamiento: La desinfección de equipos contaminados es efectiva mediante el uso de hipoclorito de sodio e iodóforos. También es efectivo el secado de los implementos (24 h) ya que los Oomycetes no resisten la desecación.

La enfermedad ha sido detectada en: (a) Asia, en la región del Asia Menor; (b) Europa, a través de todo el continente.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Bower et al. 1994; O.I.E. 2000).

1.2.8. VIROSIS MORTAL DE LOS GENITORES.

Enfermedad producida por un virus denominado SMV (*spawner-isolated mortality virus*), clasificado tentativamente dentro del grupo de los parvovirus. Los cambios histopatológicos asociados al virus no son específicos. Los animales infectados presentan infiltración hemocítica, necrosis, y descamado celular en el lumen del intestino medio y del hepatopáncreas. La enfermedad ha causado mortalidades significativamente altas en juveniles y subadultos de camarones penaeidos.
Categoría de la Enfermedad: Peligrosa [A]

La infección y enfermedad ha sido reportada solamente en poblaciones en cultivo y en individuos en cautiverio de *Penaeus monodon* y en poblaciones de cultivo y salvajes de *Cherax quadricarinatus*:
Categoría de las Especies: Riesgosa [A]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [B]
Huevos/Larvas: [0]

Modo de Infección: Ha sido transmitida experimentalmente por cohabitación e inoculación.
Tratamiento: Se desconoce.

La enfermedad ha sido detectada en: (a) Oceanía, en Australia y Filipinas.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Riesgoso [A]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Bower et al. 1994; O.I.E. 2000).

1.3. OTROS GRUPOS DE INVERTEBRADOS.

No existen antecedentes de enfermedades en otros Phyla de invertebrados bentónicos consideradas como de Alto Riesgo.

2. Enfermedades de MENOR RIESGO.

Corresponden a otras enfermedades detectadas en organismos bentónicos que forman parte de los recursos hidrobiológicos explotables y/o cultivables, actuales o potenciales de un país. El que sean reconocidas como enfermedades es el resultado de los estudios realizados por la comunidad científica internacional, pero no son de *declaración obligatoria* como aquellas establecidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Estas tampoco son de cuidado para la salud humana pero potencialmente perjudiciales para la actividad económica. En la mayoría de ellas se desconoce sus efectos sobre la ecología de las poblaciones naturales de un recurso en cuestión, aunque es de esperar que forman parte del sistema biológico en que estas se encuentran.

2.1. MOLUSCOS.

2.1.1. VIROSIS.

Epizootia producida por un amplio espectro de especies de virus que atacan tanto a juveniles y adultos (grupos Birnaviridae, Iridovirus, Papovavirus, Picornaviridae y Retrovirus tipo B) como a estados larvales (Herpesvirus e Iridovirus). En la mayoría de los eventos, una alta prevalencia de estos virus se relacionó a una alta mortalidad, principalmente en los estados larvales. En adultos los efectos pueden corresponder a infecciones hemocíticas, infecciones pancreáticas, infecciones en el corazón, pie, manto y tejido conectivo, neoplasia, necrosis de branquias, células con núcleos hipertrofiados en epitelios y pérdida de células epiteliales digestivas. En larvas, se han reportado lesiones al velum.
Categoría de la Enfermedad: Riesgosa [B]

La presencia de virosis ha sido observada en adultos de *Crassostrea angulata*, *Mya arenaria*, *Pecten maximus*, *Pecten novaezelandiae*, *Pinctada fucata martensii*, *Pinctada maxima* y *Ruditapes decussatus*; en larvas y adultos de *Crassostrea gigas*; y sólo en larvas en *Ostrea edulis*
Categoría de las Especies: Suseptible [A]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [A]

Modo de Infección: Se desconoce
Tratamiento: Se desconoce

La presencia de virus ha sido detectada en: (a) USA y Canadá
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Suceptible [B]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Oprandy *et al*. 1981; Hine *et al*. 1992; Nicolas *et al*. 1992; Bower *et al*. 1994; Elston 1994; Elston 1997; Hine and Wesney 1997; Hine *et al*. 1998; Comps *et al*. 1999; Miyazaki *et al*. 1999; Renault *et al*. 2000; Arzul *et al*. 2001a; Arzul *et al*. 2001b).

2.1.2. BACTERIOSIS.

Epizootia producida por un amplio espectro de especies de bacterias que atacan tanto a juveniles y adultos (bacterias del grupo de los vibrios, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio pectinicida*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio tapetis* y *Vibrio tubiashii*; *Pseudomonas*; Chlamydiae y Rickettsiae) como a estados larvales (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio pectinicida* y Rickettsiales). La consecuencia de una alta prevalencia de bacterios se relaciona desde una alta mortalidad del hospedador hasta la ausencia de efectos. En adultos los efectos se traducen en atrofia gonadal y del manto, además de necrosis y abscesos en el músculo abductor, en túbulos renales y glándulas digestivas. En larvas, no se han reportado lesiones.
Categoría de la Enfermedad: Riesgosa [B]

La presencia de bacterias ha sido observada en adultos de *Aequipecten (Chl.) opercularis*, *Argopecten purpuratus*, *Hippopus hippopus*, *Mercenaria mercenaria*, *Mizuhopecten (P.) yessoensis*, *Mya arenaria*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *Pecten maximus*, *Pinctada maxima*, *Placopecten magellanicus*, *Ruditapes philippinarum*, *Siliqua patula*, *Tapes philippinarum*, *Venerupis rhomboides*; y en larvas y adultos de *Argopecten irradians* y *Crassostrea gigas*.
Categoría de las Especies: Suseptible [B]

Otras Especies: [0]

Fases del ciclo de vida de las especies susceptibles a la infestación:
Adultos: [A]
Juveniles: [A]
Huevos/Larvas: [A]

Modo de Infección: Se desconoce (?)
Tratamiento: Se desconoce

La presencia de bacterias ha sido detectada en: (a) América del Norte, en Estados Unidos; (b) América del Sur, en Chile; (c) Asia, en China; (d) Europa, en Francia.
Categoría de los Continentes, Países y Regiones: Suceptible [B]

Otros Continentes, Países y Regiones: [0]

Referencias: (Gulka *et al*. 1983; Gulka and Chang 1984; LeGall *et al*. 1988; LeGall *et al*. 1991; Haaker *et al*. 1992; Norton *et al*. 1993; Vanblaricom *et al*. 1993; Bower *et al*. 1994; Gardner *et al*. 1995; Riquelme *et al*. 1995; Borrego *et al*. 1996; Nicolas *et al*. 1996; Friedman *et al*. 1997; Lambert *et al*. 1998; Antonio *et al*. 2000; Lohrmann 2000; Moore et al. 2000; Lohrmann *et al*. 2001; Moore et al. 2001).

2.1.3. LABYRINTHULOMYCOTA

Labyrinthuloides haloitidis es un representante de este phylum que causa mortalidades en juveniles de abalón (*Haliotis kamtschatkana* y *H.aliotis rufescens*), destruyendo el pie y la cabeza de estos animales.

Distribución: En la costa oeste de Canadá.

QPX (*Quahog Parasite Unknown*) infecta a la almeja *Mercenaria mercenaria* causando significativas mortalidades, especialmente después del segundo año de vida.

Distribución: Canadá y Costa Este de Estados Unidos.

Referencias: (Bower 1987a; Bower 1987b; Whyte *et al*. 1994; Ford *et al*. 1997; Ragone-Calvo *et al*. 1998; Ragan *et al*. 2000)

2.2. CRUSTÁCEOS

2.2.1. ALGAE.

Hematodinium spp. Dinoflagelados que habita en huevos, estómago, tejidos blandos y senos hemales de crustáceos marinos. Se he descrito en numerosos crustáceos, entre ellos *Cancer pagurus, Carcinus maenas, Portunus depurator, Callinectes sapidus, Nephrops norwegicus*. En algunos casos de infestación severa, provoca mortalidades.

Distribución: Europa, Costa Este de Estados Unidos.

Referencias: (Bower *et al*. 1994; Stentiford *et al*. 2002)

TÍTULO I.1.2.

TÉCNICAS DE MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES

Las técnicas y la información entregada en este capítulo tienen su origen en los estudios realizados por la comunidad científica. Los procedimientos descritos están dentro de los más utilizados y responden a la realidad nacional.

1. TÉCNICAS DE EXAMINACIÓN.

1.1. HISTOPATOLOGÍA.

El examen histológico de los organismos, ya sea con signos de alguna enfermedad o aparentemente sanos, es el mejor método de examen no específico cuando se desconoce qué parásito o presunto patógeno se encuentra presente en estos organismos. La histología debe ser utilizada siempre antes o junto a otras técnicas de diagnóstico, ya que provee una gran cantidad de información. Cuando ocurre mortalidad, muchas veces los decesos se encuentran asociados a más de un patógeno, o a una pérdida de condición debido a desove, lo que sólo puede ser determinado mediante histología.

El número de animales que debe ser muestreado para encontrar cualquier parásito que esté a una prevalencia de 2% o más, con una confianza del 95%, es de 150.

La mayoría de los presuntos patógenos son de tamaño muy pequeño, lo que hace difícil una descripción detallada que permita la identificación de la especie a microscopía de luz. El microscopio electrónico de transmisión tiene una resolución muchísimo mayor, sin embargo es necesario contar con animales que tengan una gran intensidad de infección con un determinado parásito, ya que las muestras para este instrumento no deben exceder un mm^3 de tamaño. Otra restricción de la microscopía electrónica de transmisión es lo oneroso que resulta, dado el alto costo de los fijadores, principalmente el tetróxido de osmio, que es indispensable para ver las membranas, el acetato de uranilo que tiñe el ADN, las resinas epóxicas para incluir el material. Se suma a esto, el largo trabajo que significa preparar y cortar el material en el ultramicrótomo, y el alto costo de operación del microscopio. El microscopio electrónico de barrido es menos oneroso, y si bien no permite ver la ultra-estructura interna, también es de enorme ayuda, en especial cuando interesan características de la superficie de los organismos. Por ejemplo, se utiliza para distinguir distintas especies de haplosporidios, ya que cada una tiene una ornamentación externa diferente.

1.1.1. HISTOLOGÍA

Para muestrear las partes blandas de un invertebrado, se establecerá qué tipo de corte se hará, dependiendo de la morfología de cada grupo animal. Generalmente se saca una tajada de algunos milímetros de grosor (no más de 1cm) que incluya el mayor número de tejidos diferentes, agregando trozos de los tejidos que no quedaron incluidos en dicha tajada. Los tejidos de animales marinos se pondrán en fijador de Davidson´s, cuidando que el volumen de fijador exceda en 10 veces al volumen de las muestras. Después de 24 hrs. se cambia a etanol al 70%, y se procede a la deshidratación en etanoles de gradación creciente. Luego se aclara en xilol y se incluye en parafina.

Se realizan cortes de 5µm de espesor, los que son teñidos con hematoxilina de Harris y eosina amarillenta alcohólica. Finalmente los cortes son montados en Entellan, y puestos a secar en una estufa.

1.1.2. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Se cortan trozos de $1mm^3$ de espesor, los que se fijan rápidamente en glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato de sodio 0.2 M con 1.75% NaCl por 2 hrs. a 4˚ C. Se lava tres veces con cacodilato de

sodio y se postfija con tetróxido de osmio al 1% con buffer cacodilato por 2 hrs. a 4 ˚C. Se lava tres veces con buffer cacodilato, se tiñe en bloque con acetato de uranilo al 2% por 30 min. y se deshidrata con etanoles de gradación creciente. Se hacen tres cambios de óxido de propileno, y se incluye en Epon 812. Se cortan secciones semi-finas de 1µm de espesor con cuchilla de vidrio, las que se tiñen con azul de toluidina. Las secciones ultra-finas se realizan con cuchilla de diamante, de un espesor de 90 nm. Se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo, se observan y se toman fotografías. Esta técnica se utiliza para invertebrados marinos, si se tiene animales de agua dulce, es necesario disminuir la osmolaridad del fijador y del buffer de lavado.

1.1.3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Los tejidos con presuntos patógenos, o los parásitos aislados son fijados en glutaraldehído al 2% en agua de mar con 0.025 M cacodilato de sodio. Se deshidratan en una serie de etanoles de gradación creciente, se secan en secador de punto crítico y se montan en porta-muestras de bronce. Se sombrean con oro, se observan y se fotografían.

2. TÉCNICAS MOLECULARES.

El control efectivo de las enfermedades de invertebrados marinos requiere de métodos de diagnóstico que sean rápidos, confiables y sensibles. Las técnicas disponibles son fundamentalmente las anteriormente descritas, histología y microscopía electrónica. Sin embargo muchos parásitos son difíciles de detectar o de reconocer con estos métodods, especialmente si se encuentran presentes a bajas intensidades. En los últimos años se han comenzado a desarrollar técnicas de diagnóstico basadas en inmuno-ensayos y detección de ácidos nucleicos. Estas técnicas tienen la ventaja de presentar gran sensibilidad y especificidad, y posibilitan una búsqueda rápida de patógenos en particular en organismos acuáticos. Las técnicas más importantes son la amplificación de ADN por medio de PCR, la digestión por medio de enzimas de restricción e hibridización con sondas de ADN. La mayor sensibilidad de estas técnicas permite distinguir entre cepas de un patógeno. También es una herramienta utilísima para buscar el huésped intermedio de aquellos patógenos que no tienen un ciclo de vida directo. Esto, debido a que el ADN no cambia, aunque el parásito cambie su forma en otro huésped, podrá ser detectado. Así se encontró el huésped intermedio para el patógeno *Marteilia refringens,* que es el copépodo *Paracartia grani*. La hibridización *in situ* con sondas a ADN se utiliza para confirmar el diagnóstico de un patógeno, y además para verificar la existencia de infecciones mixtas, como es el caso de *Haploporidium nelsoni* y *H. costale.* Morfológicamente no fue posible diferenciar ambas especies a microscopía de luz, pero la hibridización *in situ* demostró que las ostras estaban infectadas por ambas especies simultáneamente.

La gran sensibilidad de estas técnicas, podría sin embargo, dar falsos positivos al detectar ADN de patógenos muertos, o restos de ADN, los que ya no serían una amenaza de enfermedad. También podrían darse falsos negativos. Es necesario validar y estandarizar estas técnicas para poder utilizarlas en forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico.

3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LOS PRINCIPALES PARÁSITOS Y PATÓGENOS.

3.1. MOLUSCOS.

Para moluscos, todos los patógenos que causan enfermedades y mortalidades son protozoos y algunos rickettsiales. Todos ellos pueden ser detectados por medio de histología, tiñendo con hematoxilina-eosina. Esto es válido para *Bonamia, Haplosporidium, Marteilia*, *Microcytos*, *Perkinsus*, todos ellos son patógenos causantes de enfermedades de notificación obligatoria ante la OIE. Por medio de la histología se pueden detectar estos patógenos, pero no se puede diferenciar entre las especies. para ello es necesario hacer microscopía electrónica de transmisión, o usar técnicas moleculares de ADN.

Para detectar *Perkinsus,* se utiliza el cultivo en medio de thioglicolato líquido como método de rutina, además de la histología.

La detección de virus en moluscos se realiza, fundamentalmente, por medio de microscopía electrónica de transmisión. En moluscos está la gran limitante que no existen líneas celulares para cultivar los virus, lo que ha retrasado la investigación. El virus *Herpes* se está detectando por medio de PCR.
Detección de Labyrinthulomycota, *Labyrinthuloides haloitidis* y QPX, se detectan en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina.

3.2. CRUSTÁCEOS.

En los crustáceos la mayoría de los patógenos que causan enfermedades son virus. Si bien no es posible ver partículas virales por medio de histología, en la mayoría de los casos se pueden reconocer las inclusiones virales y los efectos de estos sobre los tejidos de los crustáceos. Para identificar los virus es necesario hacer microscopía electrónica de transmisión o usar técnicas moleculares.

- *Enfermedad de la cabeza amarilla*: La histología es suficiente como método presuntivo en crustáceos moribundos, como diagnóstico confirmatorio se recomienda usar PCR de transcriptasa inversa. Se puede también usar microscopía electrónica de transmisión (MET) hibridización *in situ* de ácidos nucleicos o análisis "Western blot".

- *Enfermedad de las manchas blancas*: La histología es suficiente como método presuntivo en crustáceos moribundos, como diagnóstico confirmatorio utilizar PCR. Se puede también usar microscopía electrónica de transmisión (MET) hibridización *in situ* de ácidos nucleicos o análisis "Western blot"para un diagnóstico definitivo.

- *Síndrome de Taura*: La histología es suficiente para diagnosticar este virus, en las tres fases de la enfermedad.

- *Necrosis baculoviral del hepatopáncreas*: Se recomienda la histología como método de diagnóstico confirmatorio.

- *Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa*: La histología puede ser utilizada como método presuntivo de diagnosis. El diagnóstico confirmatorio se obtiene haciendo hibridización *in situ* con una sonda de ADN para el virus.

- *Plaga del cangrejo de río*: Se debe aislar el agente patógeno, el que debe ser cultivado en un medio micológico con antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias.

- *Virosis mortal de los genitores*: No sirve la histología, ya que los cambios histopatológicos son inespecíficos. Se debe usar MET.

- Para la etección de *Hematodinium*, la histología corriente es suficiente para observar la presencia de estos dinoflagelado en los tejidos.

4. MEDIDA DE LA INFESTACIÓN.

4.1. PREVALENCIA

- definida como número de hospedadores con patógenos respecto al número total de hospedadores en la muestra, expresado en porcentaje.

4.2. INTENSIDAD

- definida como el número de patógenos presentes en un hospedador (i.e. estandarizado respecto al campo de observación a un determinado aumento.

TÍTULO I.2.1.

EPIBIONTES CONOCIDOS

En este capítulo se especifican los grupos y/o las especies de epibiontes que registra la literatura. La información entregada tiene su origen en los estudios realizados por la comunidad científica, ya sea publicados en revistas internacionales, en tesis o en manuscritos no publicados.

Para los propósitos del presente manual, se define en forma general como *epibionte* de una especie a repoblar a aquel organismo que vive en o asociado a la concha, caparazón o cualquier otra parte o estructura dura o blanda que queda expuesta al medioambiente.

1. MOLUSCOS.

1.1. INVERTEBRADOS.

En general, no hay reporte de especificidad de epibiontes aunque algunas especies puedan mostrar una preferencia (mayor frecuencia) por una especie en particular. De este modo, en el presente listado no se cita el hospedador.

1.1.1. *Porifera*

- Porifera indeterminado

1.1.2. *Coelenterata*

- *Anthothoe chilensis*
- *Actinia* sp.
- Appendicularia indeterminado
- Otros Hydrozoa y Anthozoa

1.1.3. *Namatoda*

- Nematoda indeterminado

1.1.4. *Polychaeta*

- Complejo polydórico: (Géneros *Boccardia, Polydora, Dipolydora*)
- *Terabrasabella heterouncinata*
- Sabellidae indeterminado
- *Romanchella pustulata*
- Otros Spirorbidae
- *Hydroides* sp.
- Otros Serpulidae
- Cirratulidae indeterminado
- Otros Polychaeta

1.1.5. *Mollusca*

- Chitonidae indeterminado
- Otros Polyplacophora
- *Crepidula coquimbensis*
- *Crucibulum quiriquinae*
- *Scurria parasitica*

- Otros Gastropoda
- *Aulacomya ater*
- Mytilidae indeterminado
- Otros Bivalvia

1.1.6. *Crustacea*

- *Allopetrolisthes spinifrons*
- *Pinnotheres politus*
- Otros Decapoda
- Isopoda indeterminado
- Anphipoda indeterminado
- Tanaidacea indeterminado
- *Balanus laevis*
- *Elminius kingii*
- Otros Thoracica

1.1.7. *Otros grupos de invertebrados*

- Bryozoa indeterminado
- Ascidia indeterminado

1.2. ALGAS.

No hay reporte de especificidad de algas epibiontes aunque algunas especies puedan mostrar una preferencia (mayor frecuencia) por una especie en particular. De este modo, en el presente listado no se cita el hospedador.

1.2.1. CHLOROPHYTA

- *Chaetomorpha* sp.
- *Cladophora* sp.
- *Cladocera* sp.
- *Enteromorpha intestinalis*
- *Enteromorpha* sp.
- *Ulva rigida*
- *Ulva* sp.

1.2.2. PHAEOPHYTA

- *Endarachne* sp.
- *Halopteris* sp.

1.2.3. RHODOPHYTA

- *Acrosorium* sp.
- *Asparagopsys* sp.
- *Callophyllis* sp.
- *Chondria* sp.
- *Chondracanthus* sp.
- *Corallina officinalis*
- *Corallina* sp.
- *Gelidium chilense*
- *Gelidium* sp.
- *Polysiphonia* sp.
- Crustosa calcárea indeterminada

2. CRUSTÁCEOS.

La presencia de epibiosis en crustáceos es más frecuente en organismos de mayor tamaño y edad, donde el proceso de intermuda es más prolongado o el animal pasa a un estado terminal. Sin embargo, dentro de los decápodos, los cangrejos de la familia Majidae (cangrejos araña) presentan gran epibiosis producto de su conducta decorativa.

2.1. INVERTEBRADOS.

No hay reporte de especificidad de epibiontes aunque algunas especies puedan mostrar una preferencia (mayor frecuencia) por una especie en particular.

2.1.1. *Porifera*

- Porifera indeterminado

2.1.2. *Coelenterata*

- *Anthothoe chilensis*
- Otros Anthozoa
- Hydrozoa indeterminado

2.1.3. *Polychaeta*

- *Romanchella pustulata*
- Otros Spirorbidae
- Serpulidae indeterminado

2.1.4. *Mollusca*

- Vermetidae indeterminado

2.1.5. *Crustacea*

- Isopoda indeterminado
- Anphipoda indeterminado
- Tanaidacea indeterminado
- *Balanus laevis*
- *Elminius kingii*
- Thoracica indeterminado

2.1.6. *Bryozoa*

- Bryozoa indeterminado

2.1.7. *Urochordata*

- Ascidia indeterminado

2.2. ALGAS.

No hay reporte de especificidad de algas epibiontes aunque algunas especies puedan presentar una preferencia (mayor frecuencia) por una especie en particular. De este modo, en el presente listado no se cita el hospedador.

2.2.1. CHLOROPHYTA

- *Enteromorpha* sp.
- *Ulva* sp.
- Chlorophyta indeterminada

2.2.2. PHAEOPHYTA

- Phaeophyta indeterminada

2.2.3. RHODOPHYTA

- Crustosa calcárea indeterminada
- Rhodophyta indeterminada

3. OTROS INVERTEBRADOS.

La presencia de epibiosis también ha sido observada en otros invertebrados, encontrándose entre los hospedadores más relevantes el grupo de los equinodermos.

3.1. INVERTEBRADOS.

No hay reporte de especificidad de epibiontes aunque algunas especies puedan presentar una preferencia (mayor frecuencia) por una especie en particular.

3.1.1. *Crustacea*

- *Edotia* sp.
- Otros Isopoda
- *Liopetrolisthes mitra*
- *Liopetrolisthes patagonicus*

3.2. ALGAS.

No hay reporte de especificidad de algas epibiontes aunque algunas especies puedan presentar una preferencia (mayor frecuencia) por una especie en particular. Para las especies o grupos de algas epibiontes, ver punto 2.2.

TÍTULO I.2.2.

DIAGNÓSTICO DE LOS EPIBIONTES

Este capítulo es un instrumento que permite cuantificar los grupos y/o las especies de epibiontes. Con estos procedimientos se podrá calcular la *prevalencia* e *intensidad* de la epibiosis y, así, evaluar la factibilidad de la transposición.

1. MOLUSCOS

1.1. LOCALIZACIÓN DEL EPIBIONTE.

En el grupo de los moluscos, los epibiontes se encuentran estrechamente relacionados con la concha. La localización del epibionte puede estar:

i) *Bivalvos*

- en la superficie externa de la concha
- en galerías dentro de la concha que se comunican al exterior en cualquier punto de la superficie de esta
- en ampollas, evidentes a través de la superficie interna de la concha y que se comunican al exterior próximo a los bordes de estas
- entre la superficie interna de la concha y el manto, muy próximo al borde de esta
- asociados a los sifones

ii) *Gastrópodos*

- en la superficie externa de la concha
- en galerías dentro de la concha que se comunican al exterior en cualquier punto de la superficie de esta
- entre la superficie interna de la concha y el manto, muy próximo al borde de esta
- apertura de la concha

1.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EPIBIOSIS.

i) para epibiontes que PUEDEN ser individualizados (abundancia):

- número de individuos

ii) para epibiontes que NO pueden ser individualizados (abundancia relativa):

- establecer el área de la superficie de la concha

  (*a*) en que se encuentra el epibionte
  (*b*) total del animal
  (*c*) dividir (*a*) por (*b*) y multiplicar por 100, o

- distribuir cien puntos al azar en una superficie transparente del tamaño del organismo más grande:

  (*a*) establecer el número de puntos que se encuentran sobre el epibionte
  (*b*) establecer el número total de puntos que se encuentran sobre el hospedador [incluidos los de (*a*)]

(*c*) dividir (a) por (b) y multiplicar por 100

2. CRUSTÁCEOS.

2.1. LOCALIZACIÓN DEL EPIBIONTE.

En el grupo de los crustáceos, los epibiontes se encuentran estrechamente relacionados con la superficie externa del exoesqueleto (caparazón). La localización del epibionte puede estar:

- en el cefalotórax
- en los quelípedos
- en los apéndices caminadores
- en el abdomen

2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EPIBIOSIS.

i) para epibiontes que PUEDEN ser individualizados (abundancia):

- número de individuos

ii) para epibiontes que NO pueden ser individualizados (abundancia relativa):

- establecer el área de la superficie de la parte del cuerpo y/o apéndice

  (*a*) que ocupa el epibionte
  (*b*) total del cuerpo y/o apéndice
  (*c*) dividir (*a*) por (*b*) y multiplicar por 100, o

- distribuir cien puntos al azar en una superficie transparente del tamaño del área de la superficie de la parte del cuerpo y/o apéndice:

  (*a*) establecer el número de puntos que se encuentran sobre el epibionte
  (*b*) establecer el número total de puntos que se encuentran sobre el hospedador [incluidos los de (*a*)]
  (*c*) dividir (a) por (b) y multiplicar por 100

3. OTROS INVERTEBRADOS.

3.1. LOCALIZACIÓN DEL EPIBIONTE.

La localización de los epibiontes por definición está estrechamente relacionada con la superficie externa del cuerpo del animal. Así, esta puede ser:

- en la superficie externa del cuerpo
- entre las espinas corporales
- en los pliegues corporales
- en los apéndices ambulacrales
- entre la superficie externa del hospedador y la superficie interna de la estructura que el hospedador secrete o construya
- en la superficie externa de la estructura que el hospedador secrete o construya

3.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EPIBIOSIS.

- cualquiera de las metodologías descritas en los puntos 1.2. y 2.2. puede ser utilizada en la cuantificación de la epibiosis

4. MEDIDA DE LA EPIBIOSIS.

4.1. PREVALENCIA

- definida como número de hospedadores con epibiontes respecto al número total de hospedadores en la muestra, expresado en porcentaje

4.2. INTENSIDAD

- definida como el número de epibiontes presentes en un hospedador.

4.3. RELACIONES FUNCIONALES

- ambas medidas, *prevalencia* e *intensidad*, dependen del tiempo en que el hospedador ha estado expuesto a la epibiosis, o sea, en función de la edad a la cual se relaciona directamente el tamaño. Así:

i) la *prevalencia* puede ser expresada como una distribución de frecuencia respecto a la talla del hospedador

ii) la *intensidad* puede ser expresada como una función lineal respecto a la talla del hospedador

5. ESTRATEGIA DE MUESTREO Y ANÁLISIS.

5.1. El *N* muestreal óptimo para una adecuada caracterización de la epibiosis será determinado de acuerdo a lo siguiente: para cada *potencial población donante* se realizarán 3 *muestreos independientes*. En cada muestreo se tomarán al azar:

i) 200 animales que incluyan todo el espectro de tamaños presente en la población, ó
ii) 100 animales dentro de cada *grupo etario discreto*.

5.2. Cada individuo será registrado en busca de epibiontes de acuerdo a los puntos 1., 2. ó 3.

5.3. Cada muestra será analizada independientemente de acuerdo al punto 4., realizando los siguientes análisis:

5.3.1. Realizar, para cada epibionte, un análisis mediante una tabla de contingencia para la distribución de frecuencia del punto 4.3.*i*), entre

i) los 3 grupos de 200 animales, ó
ii) los 3 grupos de 100 animales de cada *grupo etario discreto*.

5.3.2. Realizar, para cada epibionte, un análisis de co-varianza (ANCOVA), para la relación funcional del punto 4.3.*ii*), entre

i) los 3 grupos de 200 animales, ó
ii) los 3 grupos de 100 animales de cada *grupo etario discreto*.

5.4. **Criterio**: Si no existen diferencias significativas en la totalidad de los análisis del punto 5.3, entre los 3 grupos de 200 animales o entre los 3 grupos de 100 animales de cada *grupo etario discreto*, entonces:
se considera el *N* muestreal como ÓPTIMO
Resultado: la epibiosis de la *potencial población donante* está ADECUADAMENTE CARACTERIZADA.

Si existe diferencia significativa en uno o más de los análisis del punto 5.3, entre los 3 grupos de 200 animales o entre los 3 grupos de 100 animales de cualquiera de los *grupos etarios discretos*, entonces:
el *N* muestreal NO se considera como óptimo.
Resultado: la epibiosis de la *potencial población donante* NO está adecuadamente caracterizada y deberá realizarse un 4º *muestreo independiente*. Seguir los procedimientos de acuerdo al punto 5.1., realizando los análisis de los puntos 5.2. y 5.3. con las 4 muestras independientes.

Si en la totalidad de los análisis, el 4º muestreo no presenta diferencias significativas con al menos 1 de los 3 grupos anteriores, entonces:
se considera el *N* muestreal como ÓPTIMO
Resultado: la epibiosis de la *potencial población donante* está ADECUADAMENTE CARACTERIZADA.

Si sigue existiendo diferencia significativa en uno o más de los análisis entre los 4 grupos de 200 animales o entre los 4 grupos de 100 animales de cualquiera de los *grupos etarios discretos*, entonces:
el *N* muestreal NO se considera como óptimo.
Resultado: la epibiosis de la *potencial población donante* NO está adecuadamente caracterizada y deberá realizarse un 5º *muestreo independiente*. Seguir los procedimientos de acuerdo al punto 5.1., realizando los análisis de los puntos 5.2. y 5.3. con las 5 muestras independientes. Esto se repetirá hasta que, finalmente, en la totalidad de los análisis no existan diferencias significativas entre el último *muestreo independiente* y cualquiera de los muestreos anteriores.

5.5. Cuando la epibiosis de una *potencial población donante* esté ADECUADAMENTE CARACTERIZADA, se procederá a realizar nuevamente los análisis del punto 5.3. con la totalidad de los animales muestreados.

ANEXO II

WORKSHOP

RESULTADOS DEL *WORKSHOP*

DESARROLLO DEL *WORKSHOP*

Los resultados del *workshop* internacional, "*INTERNATIONAL WORKSHOP RESTORATION OF BENTHIC INVERTEBRATE POPULATIONS: Genetics, Diseases & Ecology*", realizado en Coquimbo entre los días 9 y 12 de noviembre de 2002, son entregados en esta sección.

Expositores invitados.

La lista de expositores invitados que asistieron al workshop es la siguiente:

Dr. Standish Allen
Dr. Eugene Burreson
Dr. Eduardo Bustos
Dra. Mariel Campalans
Sra. Ivonne Etchepare
Dr. Mark Luckenbach
Sr. Gustavo San Martin
Dr. Warwick Nash
Dra. Claudia Venegas
MSc. Ignacio Vilchis

La institución a la cual pertenecen y el tema que trataron pueden ser visto en Libro del *workshop* (ver libro acompañante).

Número de asistentes.

El número de asistentes fue de 110 personas, representando a un total de 8 países (Alemania, Argentina, Australia, Brasil, Chile, Perú, Puerto Rico y USA.

Número de presentaciones orales.

El número de presentaciones orales fue de 29 charlas, expositores provenientes de 7 países.

Número de presentaciones en poster.

El número de presentaciones en poster fue de 8 trabajo, autores originarios de 5 países.

Programa del *workshop*

Cabe destacar que en la ceremonia de inauguración del *workshop* participó y habló el Sr. Intendente de la IV Región, Sr. Felipe Del Rio. Estuvieron presentes las siguientes autoridades: el Seremi de Economía, El Director Regional de Sernapesca, el Director Zonal de Pesca, el Sr. Vicerrector de Sede de la Universidad Católica del Norte, el Decano de la Facultad de Ciencias del Mar y el Director del Departamento de Biología Marina.

WORKSHOP PROGRAM

Day	Time	Session/Speaker	Contents
Saturday	09:30 – 10:30	Registration	
	10:30 – 11:30	Opening Ceremony	
	11:30 – 12:00	**Coffee Break**	
		Opening talk	
	12:00 – 12:50	Wolfgang Stotz	Why restoration or stock enhancement: growing needs for invertebrate fisheries in Chile.
	13:00 – 14:30	**Lunch**	
		Genetic considerations	
	14:30 – 15:20	Standish Allen	Genetic considerations for hatchery based restoration of oysters in Chesapeake Bay
	15:20 – 15:40	Elisabeth von Brand	Genetics of Marine Mollusks in Chile: an overview.
	15:40 – 16:00	**Coffee Break**	
		Consideration of diseases & pests	
	16:00 – 16:50	Eugene Burreson	Disease implications for restoration of invertebrate populations

16:50 – 17:10	Mariel Campalans	Pathologies affecting Chilean cultivated mollusks
17:10 – 17:30	Karin Lohrmann	The value of surveys on healthy populations: scallops as an example
17:30 – 17:50	**Coffee Break**	
17:50 – 18:20	Claudia Venegas	Diseases as a limiting factor on crustacean restoration: Emphasis on the health status management and OIE notifiable diseases
18:20 – 18:50	Any Riveros-Aliaga	Alterations at different levels of biological organization in mussels as health indicators
18:50 – 19:10	Galaviz Villa I., F. Lango Reynoso, M. Castañeda Chávez & B. E. Sánchez Domínguez	Evaluation of the presence of *Vibrio* spp. in the La Mancha and Alvarado Lagoonal systems at Veracruz, Mexico: Using *Crassostrea virginica* as a Bioindicator
19:15	**Welcome Reception**	

Day	Time	Session/Speaker	Contents
Sunday		**Biology, ecology and management**	
	09:30 – 10:20	Mark Luckenbach	Oyster Reef Habitat Restoration: Ecological Benefits and Restoration Approaches
	10:20 – 10:40	Aswani Volety, S. G. Tolley & J. T. Winstead	Utilizing shellfish responses to set target water quality conditions for the restoration of oyster reefs in the Caloosahatchee Estuary, Florida.
	10:40 – 11:00	Torres, J.L., M. Ashton & E. Weil	Population structure of *Diadema antillarum* (Philippi) in La Parguera, Puerto Rico: 17 years after the mass mortality event
	11:00 – 11:20	**Coffee Break**	
	11:20 – 12:00	Ivonne Etchepare	Which is the more productive alternative for overexploited benthic resources : Restoration or Extensive Culture?
	12:00 – 12:20	Marcela Cantillánez & M. Avendaño	Collection and repopulation of *Argopecten purpuratus* spats in "La Rinconada" marine reserve, Antofagasta-Chile.
	12:20 – 12:40	Miguel Avendaño & M. Cantillánez	Extraction, and translocation of the *pectinid Argopecten purpuratus* within Mejillones Bay, Chile
	12:40 – 13:00	Ernesto Olavarría	Seed production for the clam *Venus antiqua* in hatchery, an alternative for the recovery of natural stocks.
	13:00 – 15:00	**Lunch**	
	15:00 – 15:20	Gabriel Jerez, A. Venegas & L. González	Restoration Pilot Plan of the sea urchin *Loxechinus albus* in the management area of caleta Maitencillo, V Region.
	15:20 – 15:40	Sylvio Zamora	Restocking of a sea urchin population in a management area using adults.
	15:40 – 16:00	Javier Soto, Sandra L. Marín & Javier Valencia	A procedure to evaluate the potential success of restocking programs: *Loxechinus albus* in the Xth region as an example.
	16:00 – 16:20	**Coffee Break**	
	16:20 – 17:10	L. Ignacio Vilchis, Kristin L. Riser, and Paul K. Dayton	Incorporating environmental variability into fisheries management: the role of El Niño in the collapse of the California Red Abalone.

	17:10 – 17:30	Bob Pennington, C. Dixon, R. Day & S. Huchette	Outplanting the seeds of success: abalone stock enhancement
	17:30 – 18:30	**Poster Session**	**Ecology, Techniques and Case Studies**

Day	**Time**	**Session/Speaker**	**Contents**
Monday	09:20 – 09:40	Edward Barriga, M. Quiroz, A. Tejada, S. Zevallos & C. Montero	Investigation and management area of benthic resources in the natural bank of Pocoma – Ilo – Peru pilot project.
	09:40 – 10:00	R. Sánchez, J. Arenas & Luis Soldán V.	Special Concessions for Aquaculture at Reserva Nacional de Paracas, Ica, Peru.
	10:00 – 10:20	Stefan Austermühle	Conservation of Guano Islands as a tool for the Recuperation of Protected and Commercial Marine Species in Peru and the Sustainability of Artisan Fisheries.
	10:20 – 10:40	Marcela Avila, M. Núñez & H. Cortés	Restoration of *Sarcothalia crispata and Gigartina skottsbergii* in Southern Chile.
	10:40 – 11:00	Verena Häussermann	Do sea anemones influence the resettlement of economically important species?
	11:00 – 11:20	**Coffee Break**	
	11:20 – 11:40	Manuel G. Quintana, D.C. Pérez, J.G. Peso & A.C. Mercado-Laczkó	First trials for restoration of endangered gastropod mollusks (*Genus aylacostoma*) in the Paraná River, Downstream Yacyaretá Dam (Argentina, Paraguay)
	11:40 – 12:00	Günther Försterra	Reconstructing a lost world – the need for reproducible inventory methods
	12:00 – 12:50	Warwick Nash	The importance of fisheries management to the success of stock replenishment programs
	12:50 – 13:00	**Official Photo of participants**	
	13:00 – 14:30	**Lunch**	
		Needs for regulation	
	14:30 – 15:20	Gustavo San Martín	Regulations regarding restoration in Chile
	15:20 – 15:40	Wolfgang Stotz	Introduction to working groups: a first draft of regulations
	15:40 – 16:00	**Coffee Break**	
	16:00 – 16:45	Elisabeth von Brand	Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding genetic considerations
	16:45 – 17:30	Karin Lohrmann	Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding diseases and pests
	17:30 – 18:15	Domingo Lancellotti	Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding transport
	18:15 – 19:00	Wolfgang Stotz	Presentation and discussion of a first draft for regulations regarding seeding or release

Day	**Time**	**Session/Speaker**	**Contents**
Tuesday	09:00 – 10:30	Working group leaders and invited speakers	Presentation of results to plenary and roundtable
	10:30 – 10:50	**Coffee Break**	
	10:50 – 11:40	Eduardo Bustos & Cecilia Godoy	Restoration or stock enhancement in management areas: a development alternative for artisanal fisheries

12:00 Departure to Official Lunch – Restaurant Chiringüito – Las Tacas

POSTER SESSION
Ecology, Techniques and Case Studies
Sunday, 17:30 – 18:30

Number	Authors	Title
1	Tolley S. G., A. K. Volety and J. T. Winstead.	Influence of freshwater inflow and water management on oyster-reef resident organisms: implications for ecosystem restoration
2	Olguín A. and N. Barahona	Estimation of the seasonal and annual growth of Concholepas concholepas (Mollusca: Muricidae) by means of marking and recapture
3	Rizzo, A.E., F. S. MacCord and A. C. Z. Amaral	Reproductive features and parasitism in Hemipodia californiensis (Hartman, 1938) (Polychaeta: Glyceridae) from Brasilian Southeast
4	MacCord F. C. And A. C. Z. Amaral	Could anthropic action influence size and morphology of Scolelepis squamata (Polychaeta: Spionidae)?
5	Pacheco A. And W. Stotz	Effects of substrate availability and characteristics on the recruitment and survival of Argopecten purpuratus (Lamarck 1819)
6	Hausen T. and W. Stotz	The recruitment of Fissurella spp. In different algae microhabitats in the intertidal zone of the rocky shore of Coquimbo, Chile
7	Caillaux L., W. Stotz, J. Aburto, M. Valdebenito and D. Lancellotti	Repopulation of the macha bank in Arica: basis for the massive transfer of individuals
8	Amar G., C. Palma–Rojas and E. von Brand	Quantitative karyotype of the Chilean surf clam Mesodesma donacium

Libro de Resúmenes.

Ver libro acompañante.

Libro del *Workshop*.

A cada expositor dentro de cada uno de los temas tratados en el *workshop* se le pidió una copia de su charla, sin embargo, ninguno de ellos lo remitió. De este modo, fue imposible la edición de un Libro del *Workshop*.

LIBRO DE RESÚMENES

ANEXO III

PROTOCOLOS

TEMÁTICA I.

PLAGAS, ENFERMEDADES Y PARÁSITOS

PROTOCOLO I.

CONSIDERACIONES PARA REDUCIR LOS RIESGOS DE DISEMINACIÓN DE ENFERMEDADES, PARÁSITOS Y EPIBIONTES

Este protocolo ha sido desarrollado para ser aplicado en el traslado de organismos bentónicos que forman parte de los recursos hidrobiológicos explotables y/o cultivables de nuestro país, actuales o potenciales, pero sólo con fines de repoblamiento. Este protocolo NO debe ser aplicado al traslado de organismos para el consumo humano directo.

CRITERIOS PARA CALIFICAR INDIVIDUOS EN UNA ACCIÓN DE REPOBLAMIENTO

1.1. En el caso que el sitio a repoblar posea la condición de Zona Libre de Enfermedades de Alto Riesgo (en el marco de un Programa Sanitario oficial de Vigilancia), el repoblamiento debe ser realizado solamente con los organismos originarios de un lugar con igual calificación.

1.2. Sin perjuicio de lo anterior, se deberá realizar un análisis macroscópico e histológico de un $N \geq 60$ animales de la población donante e igual número de la población receptora, con el objeto de identificar y cuantificar todos los parásitos y epibiontes de ambas poblaciones.

1.3. Una vez realizado el estudio como en 1.2., el repoblamiento no será autorizado si una o más especies de parásitos se detectan en los animales originarios de la población donante y que no se encuentran en la población receptora. En el caso que la o las especies de parásitos se encuentren en ambas poblaciones, el traslado sólo será permitido si la prevalencia de la población donante es igual o menor que la registrada en la población receptora.

1.4. En el caso que en la población donante se detecte cualquier patógeno considerado en Lista 1, según la clasificación de enfermedades de alto riesgo (CEAR) vigente (no registrado hasta ese momento para el país), la población no podrá ser utilizada como donante.

1.5. En el caso que el repoblamiento se lleve a cabo con individuos producidos en laboratorio, el repoblamiento será autorizado solamente cuando el cultivo en el ambiente controlado no haya sufrido ningún evento epizoótico aunque haya sobrevivido gran parte de la camada.

1.6. Sin perjuicio de lo anterior, todo traslado se deberá regir, además, por la normativa sanitaria vigente para tales efectos.

TEMÁTICA II.

GENÉTICA

PROTOCOLO II.

CONSIDERACIONES PARA REDUCIR RIESGOS DE AFECTAR EL PATRIMONIO GENETICO

Este protocolo ha sido desarrollado para ser aplicado en el traslado de organismos bentónicos con fines de repoblamiento DENTRO del rango de distribución de un recurso en cuestión, independiente de las fronteras políticas.

CRITERIOS PARA CALIFICAR INDIVIDUOS EN UNA ACCIÓN DE REPOBLAMIENTO

2.1. La elección de una población donante debiera favorecer el criterio de identidad. Es decir, debiera pertenecer al grupo de poblaciones que evidencian, real o potencialmente, un mayor intercambio genético entre ellas y cuya extensión geográfica incluye el sitio a repoblar.

2.2. Si dentro de una misma macropoblación existen varias poblaciones potencialmente donantes, el repoblamiento se debiera realizar con los individuos del mayor número posible de poblaciones.

2.3. En el caso que el repoblamiento sea realizado mediante larvas o juveniles producidos en el laboratorio, se debiera utilizar el mayor número posible de reproductores para asegurar el mantenimiento de la heterocigosidad de las poblaciones donantes.

Nota: Se entenderá como mayor intercambio genético, al mayor grado de parentesco que puedan experimentar dos o más poblaciones. Esto podrá ser establecido directamente a través de cualquier procedimiento genético o, indirectamente, mediante un estudio teórico estimando cualitativamente la mayor probabilidad de intercambio genético a través de intercambio larval. En esto último deberá ser considerada la proximidad de las poblaciones y el patrón de circulación de las corrientes.

TEMÁTICA III.

TRANSPORTE DE ORGANISMOS BENTÓNICOS

PROTOCOLO III.

CONSIDERACIONES PARA REDUCIR RIESGOS AMBIENTALES EN EL TRANSPORTE DE ORGANISMOS BENTÓNICOS

Este protocolo ha sido desarrollado para ser aplicado en el traslado de organismos bentónicos que forman parte de los recursos hidrobiológicos explotables y/o cultivables, actuales o potenciales, de nuestro país, pero sólo con fines de repoblamiento.

TRASLADO DE ADULTOS, JUVENILES Y LARVAS.

3.1. El traslado, en todos sus aspectos y etapas, debe considerar la preocupación por el bienestar del organismo.

3.2. El traslado de recursos hidrobiológicos en cualquiera de sus etapas, estados y origen deberá contar con la documentación pertinente (guía de despacho, guía de libre transito, certificado sanitario, etc.).

3.3. Las medidas a considerar en el traslado de una especie con fines de repoblamiento deberán estar acorde con el título X y XIV del "Reglamento sobre las medidas de protección, control y erradicación de las enfermedades de alto riesgo para las especies hidrobiológicas", sin perjuicio de los programas sanitarios generales que se elaboren.

3.4. Sin perjuicio de lo anterior, el traslado de animales deberá incluir un *plan del traslado*, donde se establecerá:

(a) itinerario del traslado (ruta y medio de transporte a utilizar)
(b) lugar de disposición de organismos muertos
(c) lugar de disposición de residuos líquidos
(d) desinfección del medio de transporte
(e) desinfección/eliminación de residuos sólidos

3.5. De requerirse, el plan de traslado anterior deberá establecer, durante el transcurso del viaje, el reemplazo de la matriz líquida en donde se encuentran los organismos o del agua utilizada para mitigar la desecación sufrida por estos. De este modo, al momento de liberar los organismos estos ya estén en la matriz líquida del lugar receptor o hayan sido bañados con agua de ese lugar. En el caso que el lugar donante tenga un historial de plagas, el recambio de agua durante el traslado será siempre obligatorio. En toda ocasión, el reemplazo de la matriz líquida y los baños deberán realizarse en tierra firme y lejos de cursos de aguas.

3.6. El traslado deberá incluir un *plan de contingencia* en caso que suceda una eventual mortandad masiva durante el traslado, indicando:

(a) potenciales lugares de disposición de los organismos muertos a lo largo de la ruta de traslado
(b) desinfección/eliminación de residuos líquidos o sólidos
(c) desinfección del medio de transporte
(d) la toma de muestras para determinar la(s) causa(s) de mortalidad

Nota: la condición de mortandad masiva deberá quedar establecida en el momento de autorizar el repoblamiento. Entre los criterios a considerar están (*i*) grado de polución a generar en el lugar a repoblar, (*ii*) el costo de búsqueda y separación de individuos vivos y (*iii*) inviabilidad del repoblamiento con los individuos que aún permanezcan vivos.

TEMÁTICA IV.

LIBERACIÓN DE ORGANISMOS BENTÓNICOS

PROTOCOLO IV.

CONSIDERACIONES PARA REDUCIR RIESGOS DE DAÑO AMBIENTAL EN LA LIBERACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE ORGANISMOS BENTÓNICOS

Este protocolo ha sido desarrollado para ser aplicado en la liberación y establecimiento de organismos bentónicos que forman parte de los recursos hidrobiológicos explotables y/o cultivables, actuales o potenciales, de nuestro país y sólo con fines de repoblamiento.

LIBERACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE ADULTOS, JUVENILES Y LARVAS.

4.1. El proceso de liberación y establecimiento debe respetar en todas sus etapas el bienestar de los organismos.

4.2. El proceso de liberación deberá contar, obligatoriamente, con una *línea base* del sector a repoblar que considere los elementos del sistema que pudieran verse modificados por la acción de repoblamiento.

4.3. Con el objeto de facilitar la evaluación posterior de la acción de repoblamiento, la línea base deberá incluir un registro de los principales factores ambientales, relevantes para la especie, que deberán ser tomados en el momento de la liberación. Estos debieran incluir parámetros físicos, químicos y biológicos.

4.4. En el caso que en la liberación o en el establecimiento se tenga contemplado realizar manipulaciones del ambiente para facilitar la acción de repoblamiento, su efecto sobre el ambiente deberá estar debidamente evaluado (preferentemente mediante estudios de terreno). Esto hace referencia a:

(a) modificación del substrato
(b) control de depredadores
(c) control de especies competidoras
(d) incorporación de jaulas, cercos, u otras instalaciones.

4.5. La liberación deberá contemplar un *programa de seguimiento* de la comunidad intervenida, con el objeto de evaluar en el mediano y largo plazo el efecto de la acción sobre la población de interés y sobre el ambiente, señalando los indicadores correspondientes. Esto debiera contemplar:

(a) abundancia de la especie repoblada
(b) abundancia de sus especies presa (si corresponde), depredadores y competidores
(c) los factores ambientales considerados en el punto 4.3

ANEXO IV

DOCUMENTACIÓN AUDIOVISUAL DEL REPOBLAMIENTO

ANEXO V

HATCHERY

Requerimientos Generales para el Cultivo de Larvas de Macha en Ambiente Controlado.

La Universidad Católica del Norte (UCN) se ha unido al desafío de producir masivamente semillas de machas, logrando en el año 2001 las primeras producciones a pequeña escala. Hoy en día, la UCN cuenta con el financiamiento de un proyecto FONDEF para desarrollar dicha tecnología.

I. Instalaciones básicas para realizar un cultivo de machas en condiciones controladas:

1. Sala de acondicionamiento o manutención de reproductores.

El Laboratorio de Producción de la Universidad Católica del Norte dispone de 400 m^2 para la manutención de reproductores en condiciones controladas (Figura 1). Esta sala está implementada con 6 estanques de fibra de vidrio destinados a este tipo de actividad, los que cuentan con agua circulante y aireación constante. Además, si el acondicionamiento de la especie lo requiere, se dispone de agua a diferentes temperaturas y se puede controlar el fotoperíodo.

2. Sala de cultivo de larvas.

Corresponde al espacio físico destinado a la instalación de estanques de fibra de vidrio de 500 y 5000 l, preferentemente cónicos (Figuras 2 y 3). En estos estanques se realiza el cultivo larval y están implementados con aireación permanente, agua microfiltrada y, si el caso lo requiere, se puede implementar un cultivo a temperatura constante y a varios grados superior a la temperatura ambiente.

3. Sala de cultivo de microalgas.

El alimento utilizado para este cultivo son las microalgas de las especies *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. En el área de producción de la Universidad Católica del Norte se utiliza, por lo general, mezclas de estas dos especies de microalgas, habitualmente en una proporción 1:1. La universidad cuenta con toda la infraestructura necesaria para la producción masiva de microalgas:

Cepario: sala en donde se mantiene un stock de varias cepas de microalgas bajo condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes (Figura 4).

Sala de cultivo intermedio: recinto en donde se cultivan microalagas en matraces y botellones de hasta 10 litros (Figura 5).

Sala de cultivo masivo: esta sala corresponde a la dependencia donde se realiza la etapa final del cultivo (Figura 6). Las microalgas son cultivadas en cilindros de 500 l, para luego ser entregadas como alimento para los distintos cultivos larvales o para alimentar reproductores.

4. Laboratorio.

Sala destinada al equipamiento óptico y de análisis de muestras. En este caso la sala esta implementada con microscopio, balanza, estufa, etc.

5. Sala de maquinas.

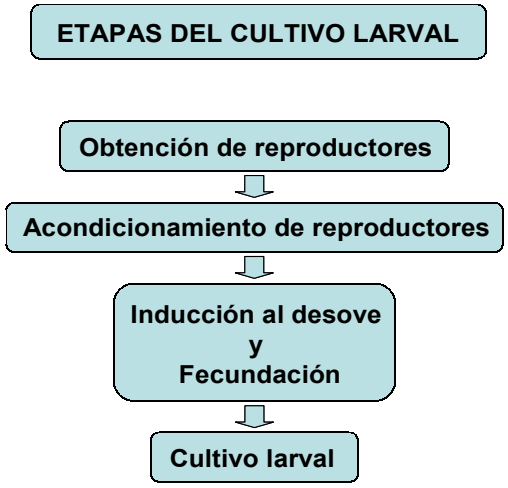
Sector destinado a la instalación de bombas que permiten abastecer al centro de cultivo del agua necesaria para realizar su actividad. Además, se encuentra un equipo electrógeno para hacer funcionar las bombas en caso de faltar la energía eléctrica.

6. Abastecimiento de agua.

El área de producción de la Universidad Católica del Norte, cuenta con un abastecimiento constante de agua de mar, la que se hace pasar por filtros de arena. Estos atrapan partículas superiores a las 60 µ (Figura 7). El agua que se destina al cultivo de microalgas, acondicionamiento o manutención de los reproductores y al cultivo de larvas requiere de una filtración más fina. Aquí se utilizan filtros de cartucho, los que se colocan en serie en orden decreciente, hasta obtener un filtrado que retiene partículas mayores a 1 µ. Además, para la producción de microalgas el agua es esterilizada con luz ultravioleta (UV).

7. Etapas del cultivo de larvas de macha

Las principales etapas del cultivo de larvas de macha en ambiente controlado son las siguientes:



Obtención de reproductores: La calidad de los reproductores tiene gran importancia en la producción de larvas o semillas en un sistema controlado. En este proyecto se obtuvieron reproductores de dos bancos: Peñuelas, sector Caleta San Pedro en la Bahía de Coquimbo y Playa Larga, en la Bahía Tongoy.

Acondicionamiento de reproductores: Para la obtención de larvas es necesario contar con gametos de buena calidad, los que provienen de ejemplares sexualmente maduros. Como el período de maduración corresponde esencialmente a la época de primavera e inicio del verano, el grado de maduración no es similar en todos los animales. Para solucionar este inconveniente se generó un sistema que permite mantener ejemplares en cautiverio e intentar mejorar su condición gonadal.

El sistema de acondicionamiento consiste en un estanque de plástico, con agua corriente y el fondo cubierto con una capa de arena de unos 8 cm de espesor (Figura 8). La alimentación que reciben los reproductores durante el período de acondicionamiento, consiste en una mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* en proporción 1:1, administrada en forma diaria en una concentración de 150.000 a 200.000 células ml^{-1}. Los reproductores se mantienen a temperatura ambiente, que es 1 a 2 ºC superior que la temperatura que se registra en la Bahía de la Herradura de Guayacán, lugar desde donde se extrae el agua.

Inducción al desove y fecundación: Para inducir al desove se usó una mezcla de técnicas: *shock* térmico y peróxido de hidrógeno. Esta consiste en someter a los ejemplares seleccionados a un aumento de 4 ºC, provocando un estrés, más una estimulación química con agua pasada por una lámpara de luz ultravioleta. Este proceso se realiza por una hora, para luego colocar las machas en acuarios individuales en donde se dejan por un par de horas. Luego se toma una muestra de agua y se observa al microscopio para verificar la presencia de gametos. Otra forma de obtener gametos, ampliamente usada en machas, es el *stripping*, técnica en donde se quita y rompe la gónada para obtener los espermios y ovocitos.

Luego de obtener los gametos de ambos sexos por separado y haber evaluado su calidad al microscopio (se utiliza como criterio de buena calidad la esfericidad de los ovocitos y la alta motilidad de los espermios), se procede al lavado y tamizado de los ovocitos utilizando una malla de 44 µ de abertura. Los ovocitos son depositados en un estanque con agua de mar filtrada y esterilizada, a temperatura ambiente. Por último, se realiza la fecundación agregando los esperma en una relación 5:1.

El éxito de la fecundación se verifica por la formación de la membrana vitelina, lo que se observa al microscopio. Posteriormente se eliminan los espermios sobrenadantes y se ponen los huevos sobre un tamiz de 44 µ lavándolos suavemente con agua esterilizada. Los huevos retenidos en el tamiz son llevados a un estanque, dejándolos en reposo por 48 horas.

Cultivo larval: Después de 48 horas se obtiene la larva D, procediendo a la selección de las larvas que se utilizarán para el cultivo. En esto, las larvas se tamizan con mallas de 90 y 50 µ. El primer tamiz se usa para retener partículas grandes y en el segundo quedan retenidas las larvas que se utilizan para el cultivo, eliminándose ovocitos y larvas deformes. Luego se verifica la calidad de las larvas y se cuentan. Una vez cuantificadas se dejan en estanques cónicos de 500 l o de 5000 l, con agua de mar filtrada a 1 µ en una densidad de 5 larvas ml^{-1}. A partir de esta etapa se inicia la alimentación con microalgas (*Isochrysis* y *Chaetoceros*) en una mezcla 1:1 a una concentración de 20.000 a 22.000 células ml^{-1}. Diariamente se debe alimentar, cambiar el agua y limpiar los estanques de cultivo. Cada dos a tres días se tamiza las larvas para eliminar larvas pequeñas y deformes. Este procedimiento se mantiene hasta tener larvas competentes entre las 300 y 325 µ.

Figura 1.
Vista parcial de la sala de manutención de reproductores. Se muestran estanques en los cuales se mantienen reproductores en acondicionamiento.

Figura 2.
Vista parcial de la sala de larvas. En los estanques de 5000 l se está realizando un cultivo de machas.

Figura 3.
Vista parcial de una de las salas de cultivo de larvas con estanques de 500 l.

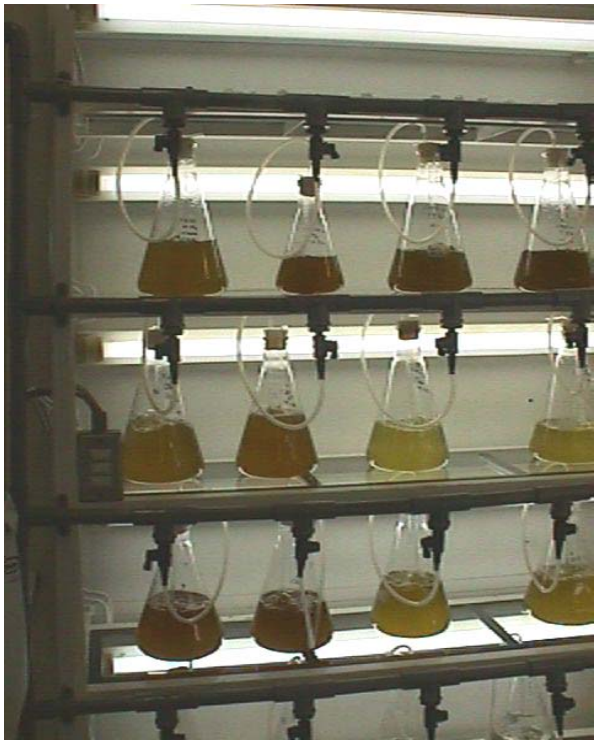


Figura 4.
Vista parcial cepario de microalgas.

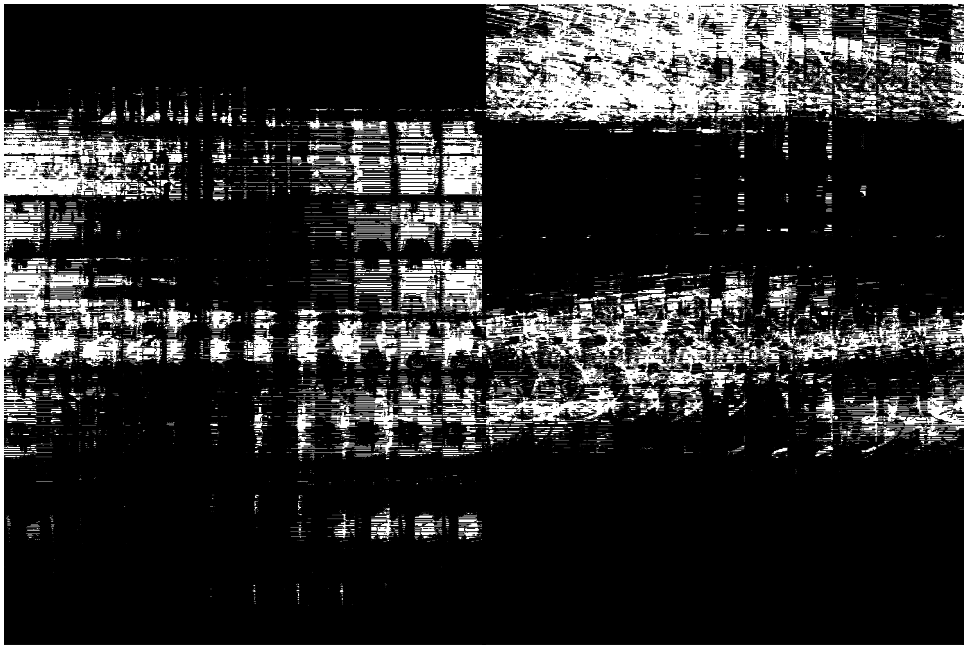


Figura 5.
Sala de cultivo intermedio de microalgas.

Figura 6.
Sala de cultivo masivo de microalgas.

Figura 7.
Unidad de control de la red hidráulica y filtrado de agua de mar.

Figura 8.
Estanques de acondicionamiento de reproductores de macha.

ANEXO VI

PERSONAL PARTICIPANTE POR ACTIVIDAD

TABLA VI.1.

Dedicación horaria mensual, durante los primeros 8 meses de ejecución del proyecto, del personal participante en el proyecto en cada una de las actividades realizadas. Las actividades son identificadas con los nombres que se les dio en el diseño original del proyecto, con algunas variaciones menores que se han generado en la ejecución del proyecto.

	Horas de dedicación por mes							
Etapas y tareas recursos humanos	**Ene**	**Feb**	**Mar**	**Abr**	**May**	**Jun**	**Jul**	**Ago**
Coordinación								
Wolfgang Stotz	16h	16h	16h	16h	16h	16h	16h	16h
Etapa 1. Preparación del proyecto								
Wolfgang Stotz	16h	12h	28h					
Domingo Lancellotti	16h	32h	28h					
Pablo Araya	16h	32h	28h					
Etapa 2. Establecimiento de protocolos								
Etapa 2.1. Recopilación bibliográfica								
Sobre enfermedades y pestes								
Karin Lohrmann			20h	40h				
Domingo Lancellotti			20h	40h				
Loreto Rodriguez			20h	22h				
Sobre problemas genéticos								
Elisabeth von Brand				20h	44h			
Domingo Lancellotti				20h	44h			
Loreto Rodriguez				20h	22h			
Sobre el traslado								
Domingo Lancellotti					40h	40h		
Jaime Aburto					40h	40h		
Pablo Araya					18h	18h		
Sobre la liberación								
Wolfgang Stotz						16h	16h	
Domingo Lancellotti						40h	40h	
Jaime Aburto						16h	16h	
Etapa 2.2. Workshop Internacional								
Identificación y contacto de invitados – conferencistas								
Wolfgang Stotz	10h	8h	4h	4h	4h	4h	4h	8h
Karin Lohrmann	10h	8h	4h					
Elisabeth von Brand	10h	8h	4h					
Invitaciones – Primer Anuncio del evento								
Wolfgang Stotz	40h							
Karin Lohrmann	60h							
Elisabeth von Brand	60h							
Establecer el programa, definiendo lugar y fechas								
Wolfgang Stotz			24h	20h			10h	
Karin Lohrmann			18h	10h			5h	
Elisabeth von Brand			18h	10h			5h	
Segundo anuncio –construcción pagina web								
Wolfgang Stotz			10h	10h				
Karin Lohrmann				10h				
Elisabeth von Brand				10h				
Loreto Rodriguez				20h				
Organización de logística del Workshop								
Wolfgang Stotz					8h	8h	8h	16h
Karin Lohrmann								16h
Elisabeth von Brand								16h
Loreto Rodriguez					16h	16h	16h	16h

Etapa 2.3. Diseño de protocolos, manuales y matrices de decisión								
Primera versión – basada en revisión bibliográfica								
Wolfgang Stotz							20h	24h
Karin Lohrmann							20h	20h
Elisabeth von Brand							20h	20h
Domingo Lancellotti							80h	80h
Etapa 3. Experiencia piloto de repoblamiento de **machas**								
Reconocimiento de terreno y establecimiento de contactos								
Wolfgang Stotz								60h
Domingo Lancellotti								60h
Claudio Cerda*								60h
Etapa 4. Informes								
Informe de avance 1								
Wolfgang Stotz					40h			
Karin Lohrmann					40h			
Elisabeth von Brand					40h			
Domingo Lancellotti					40h			
Informe de avance 2								
Wolfgang Stotz								40h
Karin Lohrmann								40h
Elisabeth von Brand								40h
Domingo Lancellotti								40h

* Claudio Cerda es un técnico del equipo de Ecolmar que ha sido incorporado adicionalmente al equipo de trabajo del proyecto

TABLA VI.2.

Dedicación horaria por mes en el período Septiembre 2002 a Enero 2003 en cada una de las actividades realizadas. Las actividades son identificadas con los nombres que se les dio en el diseño original del proyecto, con algunas variaciones menores, que se han generado en la ejecución del proyecto.

	Meses				
Etapas y tareas recursos humanos	**Sep**	**Oct**	**Nov**	**Dic**	**Ene**
Coordinación					
Wolfgang Stotz	16h	16h	16h	16h	16h
Etapa 2. Establecimiento de protocolos					
Etapa 2.1. Segunda versión de protocolos					
Sobre enfermedades y pestes					
Karin Lohrmann	24h	24h			
Domingo Lancellotti	16h	16h			
Loreto Rodriguez	8h	8h			
Sobre problemas genéticos					
Elisabeth von Brand	24h	24h			
Domingo Lancellotti	16h	16h			
Loreto Rodriguez	8h	8h			
Sobre el traslado					
Domingo Lancellotti	24h	24h			
Jaime Aburto	16h	16h			
Pablo Araya	8h	8h			
Sobre la liberación					
Wolfgang Stotz	24h	24h			
Domingo Lancellotti	16h	16h			
Jaime Aburto	8h	8h			
Etapa 2.2. Workshop Internacional					
Organización y desarrollo del Workshop					
Wolfgang Stotz	40h	40h	80h		
Karin Lohrmann	30h	30h	100h		
Elisabeth von Brand	30h	30h	100h		
Loreto Rodriguez	80h	80h	120h		
Marcelo Valdebenito		20h	80h		
Jaime Aburto			30h		
Luis Caillaux			30h		
Pablo Araya			30h		
Claudio Cerda*			40h		
Etapa 2.3. Versión definitiva de protocolos					
Karin Lohrmann			40h		
Elisabeth von Brand			40h		
Domingo Lancellotti			40h		
Wolfgang Stotz			40h		
Etapa 3. Experiencia piloto de repoblamiento de **Machas**					
Aplicación de protocolos – experimentos de traslado y liberación – cultivo de larvas					
Wolfgang Stotz				40h	
Karin Lohrmann				80h	
Elisabeth von Brand				80h	
Loreto Rodriguez				20h	
Marcelo Valdebenito				40h	
Jaime Aburto		40h		40h	
Luis Caillaux		40h		40h	
Pablo Araya		40h		40h	
Claudio Cerda*		40h		40h	
Experiencia de traslado y liberación en Arica					
Wolfgang Stotz					72h

Loreto Rodriguez					64h
Marcelo Valdebenito					64h
Jaime Aburto					64h
Luis Caillaux					64h
Pablo Araya		40h			120h
Claudio Cerda*		40h			120h
Etapa 4. Informes		40h			
Informe de avance 3		40h			
Wolfgang Stotz					40h
Karin Lohrmann					40h
Elisabeth von Brand					40h
Domingo Lancellotti					100h

* Claudio Cerda es un técnico del equipo de Ecolmar que ha sido incorporado adicionalmente al equipo de trabajo del proyecto. Además, participaron en los experimentos de traslado y liberación dos estudiantes de Biología Marina, Sandra Baro y Paola Díaz y en el trabajo de Morfometría de machas (aplicación del protocolo) la estudiante Carolina Olivares.

TABLA VI.3.

Dedicación horaria por mes en el período Febrero 2003 a Mayo 2003 en cada una de las actividades realizadas. Las actividades son identificadas con los nombres que se les dio en el diseño original del proyecto, con algunas variaciones menores, que se han generado en la ejecución del proyecto.

	Horas de dedicación por mes			
Etapas y tareas recursos humanos	**Feb**	**Mar**	**Abr**	**May**
Coordinación				
Wolfgang Stotz	8 h	20h	18h	20h
Etapa 2. Establecimiento de protocolos				
Etapa 2.3. Versión definitiva de protocolos				
Karin Lohrmann	4h	10h	16h	6h
Elisabeth von Brand	4h	10h	16hh	6h
Domingo Lancellotti	8h	20h	24h	16h
Wolfgang Stotz	4h	16h	20h	16h
Etapa 3. Experiencia piloto de repoblamiento de **Machas**				
Experiencia de traslado y liberación en Arica				
Wolfgang Stotz		10h		80h
Pablo Araya		80h		80h
Mario Villegas*		80h		80h
Etapa 4. Informes				
Pre-**Informe Final**				
Wolfgang Stotz				40h
Karin Lohrmann				20h
Elisabeth von Brand				20h
Domingo Lancellotti				100h

* Mario Villegas es un estudiante del equipo de Ecolmar que ha sido incorporado adicionalmente al equipo de trabajo del proyecto en relación a la evaluación del redoblamiento en terreno, en Arica