

# CARACTERIZACION DE LOS ESTADOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEJERREY *BASILICHTHYS AUSTRALIS* (EIGENMANN, 1927)\*

## CHARACTERIZATION OF DEVELOPMENTAL EMBRIONIC STAGES OF THE SILVERSIDES *BASILICHTHYS AUSTRALIS* (EIGENMANN, 1927)

Laura G. Huaquín<sup>1</sup>, Nora Araya<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se caracterizan los estados del desarrollo embrionario del pejerrey (*Basilichthys australis*), de amplia distribución en aguas templadas de Chile Continental. Los estudios tendientes a su cultivo han motivado el presente trabajo. Ovocitos de hembras maduras se obtuvieron por masaje abdominal, realizándose fecundación con fluido espermático obtenido en forma similar de ejemplares machos. Se observó la evolución del desarrollo embrionario desde el huevo indiviso hasta la eclosión y se reconocieron 18 estados a la temperaturas de 14 a 22°C. El huevo fertilizado se reconoce externamente por su turgencia, el aumento del espacio perivitelino, el conspicuo micrópilo orientado en el polo animal y su gran transparencia. El período de segmentación se extiende entre las dos y las veinticuatro horas de incubación hasta la obtención del estado de blástula. El período de movimientos morfogenéticos ocurre entre las veinticuatro horas hasta alrededor de las setenta y dos horas, con la formación del escudo embrionario, período a partir del cual se inicia la organogénesis. Entre los 14 y los 16 días se produce la eclosión de las prelarvas portando un notorio saco vitelino y una bien desarrollada pigmentación.

*Palabras claves:* Ontogenia, Peces Dulceacuícolas, Atherinidae.

### ABSTRACT

The embryonic stages of development of the silversides, *Basilichthys australis* Eigenmann, a freshwater fish of wide distribution in Chile are characterized.

Oocytes from mature females were obtained by abdominal massage and fertilized with seminal fluid from male specimens.

The evolution of embryonic development was observed from the uncleaved egg stage up to hatching. Eighteen stages were obtained by using temperatures of 14°C to 22°C.

The fertilized egg is recognized for its turgescence, the increase of the perivitelline space, the conspicuous micropyle in the animal pole, and its great transparency.

Cleavage occurs between the second and twenty fourth hour of incubation, until the blastula stage is reached. The period of morphogenetic movements takes place between twenty four and seventy two hours of incubation and last until the formation of the embryonic shield, when organogenesis begins. Between fourteen and sixteen days later, hatching occurs; the larvae show a conspicuous yolk sac and a marked pigmentation.

*Key words:* Ontogenic, Freshwater fishes, Atherinidae.

### INTRODUCCION

El pejerrey, *Basilichthys australis* Eigenmann, de amplia distribución en aguas templadas de Chile Continental, es un recurso alimentario de alternativa con posibilidades

de aumentar su producción si lográramos su cultivo. Constituye uno de los recursos más abundantes en los ambientes límnicos chilenos (Soto, 1978) y está entre los peces de

\*Proyectos B-1551-8213, 8323, 8433 y 8544, Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile.

<sup>1</sup>Departamento de Silvicultura, Escuela de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Casilla 9206. Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile.

agua dulce más capturados en nuestro país (Duarte *et al.*, 1971; Moreno *et al.*, 1977). Pertenece a la familia Atherinidae, representada en las aguas continentales por otras especies caracterizadas insuficientemente.

La atherinicultura, se ha desarrollado exitosamente en Argentina y México. Ringuelet (1943) y González y Mastrarrigo (1948) han realizado estudios y prácticas de cultivos de pejerrey argentino *Odontesthes bonariensis*. De Buen (1940), realizó trabajos sobre cultivo y ontogenia en pejerreyes del género *Chirostoma* del lago Pátzcuaro en México. No se han realizado estudios en peces chilenos de agua dulce relacionados con cultivos y ontogenia y sólo se realizaron intentos de cultivo en la piscicultura de Curicó creada en 1942 para crianza de peces de aguas templadas (Hironaka, 1978).

Durante la última década, han aumentado las investigaciones en *B. australis*, referidas al estudio de aspectos ecológicos, hábitos alimentarios (Urzúa *et al.*, 1977; Bahamondes *et al.*, 1979; Vila y Soto, 1981), edad, crecimiento, ciclo reproductivo (Soto, 1978), proporción de sexos, fecundidad (Moreno *et al.*, 1977) y aspectos estructurales y ultraestructurales de ovarios y ovocitos (Cerisola *et al.*, 1978; Huaquín, 1980). Sin embargo, no hay descripciones ni ilustraciones referentes a algunos aspectos reproductivos que son fundamentales en caso de pretender su cultivo artificial.

En este trabajo se examinan las características del desove y las condiciones de fertilización. Además se caracterizan los principales estados del desarrollo embrionario de *B. australis*.

El análisis del desarrollo embrionario, comprende desde la fecundación artificial, realizada en terreno y en el laboratorio, continuando con el seguimiento del desarrollo a través de la segmentación, movimiento morfogenético, hasta la eclosión de las prelarvas.

## MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron adultos de *B. australis* en el río Angostura, afluente del río Maipo en la zona Central de Chile (33°55' Long. S.; 70°44' Long. W.), durante los períodos de reproducción natural entre agosto y enero. El material se trasladó en bidones con agua del mismo río y se mantuvo en acuarios hasta ser revisado.

## Obtención de gametos y fecundación

Las hembras maduras se hicieron desovar dentro de las 24 horas posteriores a su captura, anestesiándolas con tricainametasulfonato (M S 222) 100 mg/l y realizando un suave masaje abdominal desde las aletas pectorales hacia el poro genital. Un tratamiento similar, pero sin anestesia, permitió la obtención de espermatozoides.

Los ovocitos fueron recogidos en cápsulas plásticas en seco. Se realizaron mediciones de ovocitos sin fecundar y fecundados después de la hidratación.

De dos o tres machos se obtuvo el espeso fluido lechoso en que van compactados los espermatozoides, se dejó caer este fluido directamente sobre los huevos que estaban en las cápsulas, 30 minutos después se lavaron con agua filtrada en miliporo de 0,4 µm y se trasladaron a acuarios con esta misma agua, provistos de bomba de filtrado y oxigenación. Se impidió que los huevos fecundados permanecieran en el fondo, colocándolos en cestas de plástico horadadas, durante su incubación. Los rangos de temperaturas extremas del agua fluctuaron entre 14°C y 22°C, mediciones realizadas entre el primero y el último día de incubación.

Para evitar el desarrollo de hongos, sobre los huevos de pejerreyes, se lavaron las cestas de incubación cada tres días con una solución de acriflavina al 0,05%. Se cuantificó la mortalidad en una muestra de 193 embriones incubados en laboratorio.

Para describir los estados del desarrollo de otras especies de teleósteos se ha recurrido a remover el corion, a teñir los embriones (Saksena y Yamamoto, 1961; Long y Ballard, 1976) o a aclarar los huevos para su observación (Campos, 1972). En este caso, las observaciones, descripciones y dibujos esquemáticos de los estados del desarrollo, se realizaron en embriones vivos, aprovechando su transparencia y tamaño, alrededor de 2 mm. Además se sacaron muestras de las cestas de incubación cada dos horas los dos primeros días, y dos veces al día el resto del período de incubación, las que se fijaron en formalina al 10%, líquido de Bouin y glutaraldehído al 3% para realizar cortes histológicos y observaciones con microscopio de barrido (MEB).

Como control del desarrollo se utilizaron huevos de diferentes estados obtenidos directamente de los lugares de desove natural que se cultivaron paralelamente con los huevos fecundados en laboratorio, en las mismas

condiciones de incubación para comparar los diferentes estados del desarrollo producto de una fecundación natural, con los huevos obtenidos por masaje de las hembras fuera de su ambiente natural. Para designar y caracterizar los estados del desarrollo embrionario se ha empleado la terminología usada por Long y Ballard (1976), en el estudio del desarrollo experimental de *Catostomus commersoni*.

Las microfotografías se han obtenido con un microscopio Leitz Ortholux y un dispositivo fotográfico Aristophot. Las microfotografías de barrido se obtuvieron en el Austoscan Siemens del Instituto de Investigación y Ensayos de Materiales (IDIEM) de la Universidad de Chile.

## RESULTADOS

### Desove y Fecundación

Entre las hembras de *B. australis* capturadas con el propósito de hacerlas desovar, hubo tres comportamientos: a) Hembras que a la suave presión realizada sobre el abdomen eliminaron entre 300 a 500 ovocitos. b) Otro grupo que parece no haber estado en condiciones suficientes de maduración eliminó pocos ovocitos y no viables (20 a 40). c) Un tercer grupo de hembras aparentemente maduras, con similar tratamiento no desovaron, aunque sus ovocitos eran de un tamaño semejante a las del primer grupo.

Los ovocitos al salir del ovario a través del poro genital de la hembra, sufren una descompresión y desenrollan sus filamentos adhesivos, característicos de los aterínidos (Figura 1A). Son blandos, opacos y amarillentos. Al cabo de una hora después de la fecundación, hay cambios en la consistencia de la membrana externa, que se hidrata y se endurece. Este efecto puede observarse al presionar con una pinza. Todo esto se traduce en un aumento en la turgescencia y transparencia del huevo. Estas modificaciones pueden ser atribuidas al cambio que sufren los huevos al pasar desde el medio interno corporal al medio externo hipotónico representado por el medio dulceacuícola y a la entrada del espermio al huevo, a través del micrópilo situado en el polo animal, que provoca la liberación del contenido de los gránulos corticales con el consecuente aumento del espacio perivitelino y posteriormente la elevación del micrópilo en forma de un pequeño volcán (Figuras 1B y 1C), estructura que antes de la fecundación constituía un área depri-

mida (Figura 1D). Por el contrario, los ovocitos no fecundados pronto se vuelven opacos y en pocas horas comienza su lisis. Una descripción de los acontecimientos que siguen a la fecundación han sido estudiados en detalle por Iwamatsu y Keino (1978) en la superficie de los huevos de *Oryzias latipes*, mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Como se puede observar en la Figura 2, en una muestra de 312 ovocitos y 443 huevos provenientes de dos hembras, medidos entre el desove y los catorce días de desarrollo (antes de eclosionar), se aprecia un aumento de diámetro. Realizando un análisis de la Figura 2, podemos observar tres curvas donde es posible separar claramente los ovocitos recién desovados (no fecundados), con un diámetro modal de 1,8 mm, de los huevos fecundados en segmentación entre 1 y 24 horas y de los embriones en desarrollo dentro del corión después de 24 horas hasta 14 días de incubación, con diámetros modales de 2,2 y 2,3 mm, respectivamente. Se nota un aumento de diámetro en los últimos estados, a medida que avanza el desarrollo. Con el objeto de comprobar si existía diferencias de diámetro en las tres muestras señaladas, se realizó un análisis de varianza, donde el diámetro promedio de los 312 ovocitos recién desovados fue de 1,88 mm. En la muestra de 93 huevos recién fecundados y con embriones en segmentación se obtuvo un promedio de 2,16 mm. En la muestra de 350 embriones en desarrollo entre las 24 horas y 14 días de incubación, el promedio observado fue de 2,24 mm de diámetro. Las diferencias entre estos tres promedios fueron significativas ( $p < 0,01$ ).

Aplicando prueba de Scheffé para comparar cada una de las medias entre sí, todas las diferencias fueron significativas al 1%. La mayor diferencia se observa entre la media del primer grupo, comparada con la del grupo de mayor tiempo de desarrollo. La primera curva presenta una distribución normal, en cambio en la última, se observa una asimetría hacia los valores de diámetro más altos.

El porcentaje de huevos fecundados artificialmente, en dos muestras analizadas, arrojaron un resultado de un 91,4% de fecundación en la primera muestra con un total de 490 ovocitos y un 86,3% en la segunda, con un total de 351 ovocitos, las que provienen de dos hembras cuya longitud total (LT) fue de 175,0 mm y 205,0 mm respectivamente.

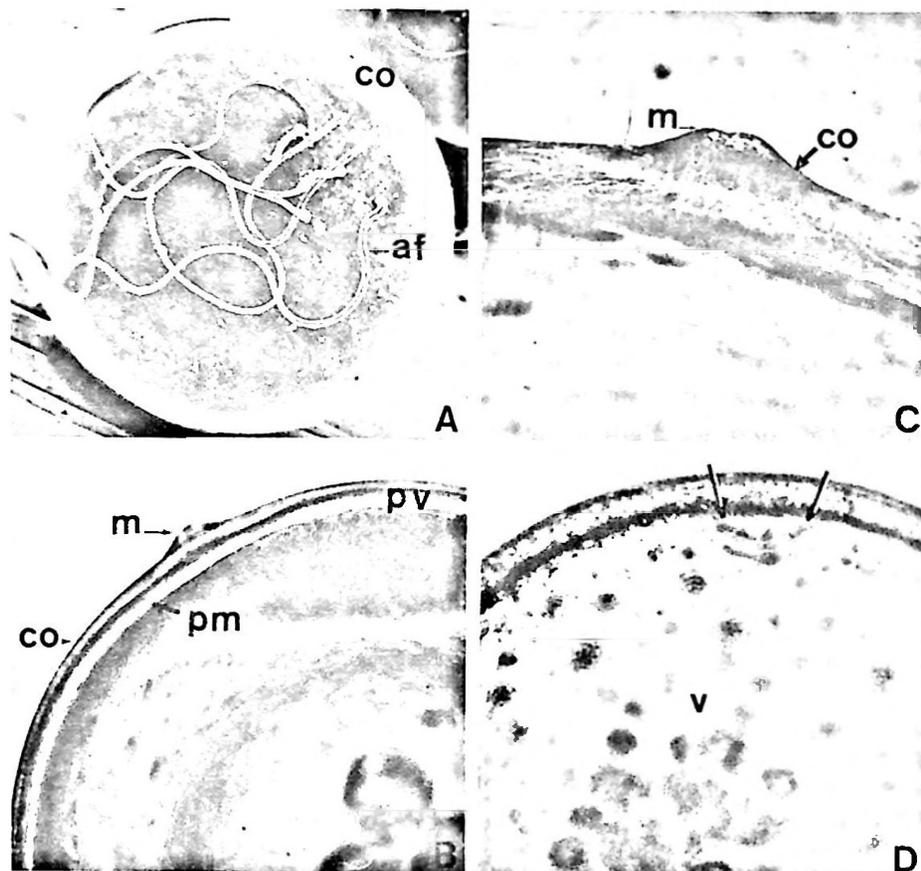


Figura 1

- A. Microfotografía con microscopía de barrido (MEB) de huevo desovado mostrando los filamentos adhesivos (af) unidos al corion (co). Diámetro 2 mm.
- B. Microfotografía con microscopía óptica del huevo fecundado, se visualiza el micrópilo (m) y la notoria separación del corion (co) de la membrana plasmática (pm) quedando entre ellas el espacio perivitelino (pv). 45x.
- C. Área del micrópilo (m) a mayor aumento, observándose esta elevación que compromete a parte del corion (co). 100x.
- D. Ovocito hidratado pero no fecundado, puede verse la zona micropilar señalada por flechas como un área deprimida. (V) - Vitelo. 100x.

Del análisis de una muestra de 193 huevos fecundados e incubados, se observó que la mortalidad de los embriones se debió principalmente a la contaminación por hongos y microorganismos, siendo ésta de un 15,5% (Tabla 1). En esta misma muestra se observaron también cinco embriones anómalos, dos de ellos con microcefalia, uno con microoftalmia, uno con anomalía caudal y un embrión doble fusionado en el extremo caudal. Este corresponde al segundo caso observado en nuestro Laboratorio (Huaquín, 1983). El primer caso de embrión doble o "siamés" se obtuvo de una muestra de huevos obtenidos en lugares de desove natural (Huaquín, 1978).

### Observaciones de los estados del desarrollo

El tiempo de desarrollo entre fecundación y eclosión de las prelarvas, fue de 15 días  $\pm$  1, a temperaturas de 14 - 22°C. Se distinguieron tres períodos o fases donde se incluyeron los estados del desarrollo, determinándose para *B. australis* 18 estados (Tabla 2).

#### I. Período de Segmentación

Estado 1. Huevo indiviso o cigoto (0-3 horas). Veinte minutos después de realizada la fecundación y una vez que se ha hidratado el corion, hay aumento del espacio perivitelino y de la transparencia del cigoto. El micrópilo

se muestra a las dos horas como una elevación bien definida en el polo animal del huevo (Figuras 1B, 1C y 4A). Localizados en el polo opuesto se observan los filamentos coriales o adhesivos (Figuras 1A y 4A), cuyo número puede fluctuar entre 0 y 10, siendo más frecuentes los huevos con 5 y 6 filamentos. En el citoplasma, el contenido vitelino es un material amarillento y traslúcido. Se observan además unos 30 a 50 glóbulos de aceite amarillentos y de diferentes tamaños, agrupados en el centro o hacia el polo vegetativo del huevo. Como la mayoría de los huevos de peces, éstos son telolecitos, por lo cual, su segmentación es meroblástica y discoidal.

Estado 2. Dos blastómeros (3-5 horas). Aproximadamente tres horas post-fecundación, en el blastodisco del huevo, se observa el comienzo del primer surco de segmentación como una hendidura que lo divide parcialmente en dos partes. El blastodisco así dividido crece hacia el espacio perivitelino, y ya entre las 4 y 4 1/2 horas post-fecundación

pueden verse completamente los dos primeros blastómeros de igual tamaño como proyecciones globosas de este disco (Figuras 3A y 4B). En el vitelo persisten gran cantidad de glóbulos de aceite de diferentes tamaños.

Estado 3. Cuatro blastómeros (5-6 horas). Como puede observarse en la microfotografía de la Figura 3B y en los dibujos esquemáticos de la Figura 4C, a 6 horas post-fecundación, ya existen cuatro blastómeros también como prominencias globosas del área germinativa, expandidas hacia el espacio perivitelino.

Estado 4. Ocho blastómeros (6-8 horas). Pueden individualizarse ocho blastómeros más pequeños, siendo menor la expansión hacia el espacio perivitelino (Figura 4D).

Estado 5. Mórula (8-20 horas). Se observan los blastómeros sin el aspecto globoso de los estados anteriores, aún pueden reconocerse sus límites celulares. Aparentemente toda el área germinativa se ve más delimitada y el conjunto toma un aspecto más uniforme, co-

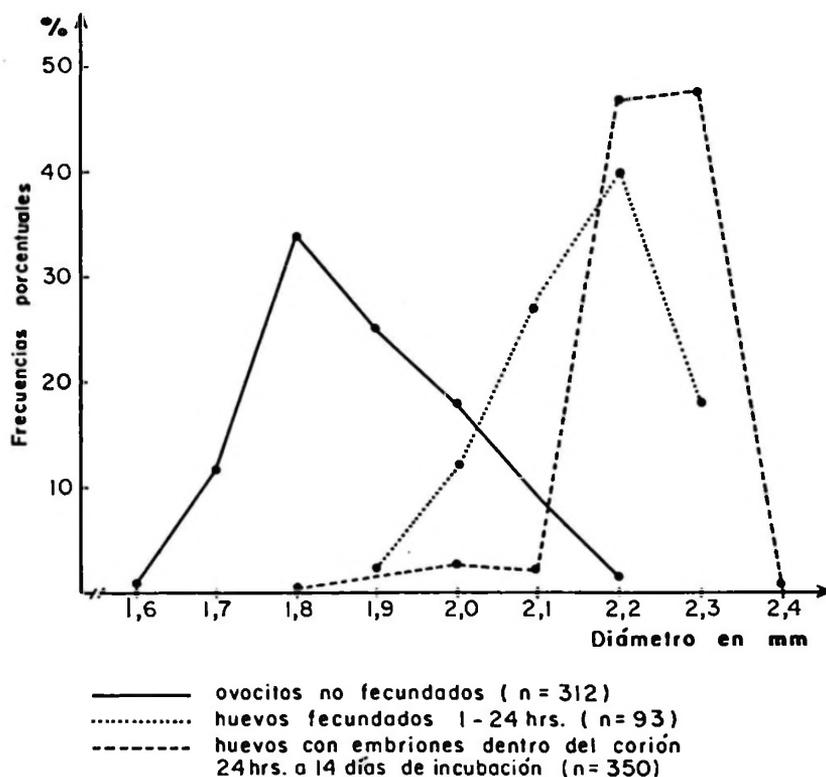


Figura 2

Distribución de frecuencias porcentuales del diámetro en un grupo de ovocitos recién desovados, en una muestra de huevos fecundados y con embriones en segmentación (1 a 24 horas de incubación) y en una muestra de huevos con embriones en diferentes estados de desarrollo después de la segmentación (24 a 14 días de incubación). Se observa una tendencia de desplazamiento de la curva en la tercera muestra a diámetros entre 2,2 y 2,3 mm.

mo puede observarse en las microfotografías de la Figura 3C, y en el dibujo esquemático de la Figura 4D.

Estado 6. Blástula (20-24 horas). En esta etapa ya no es posible reconocer el límite entre los blastómeros. Se distingue en cambio un grupo de blastómeros centrales que ocupan un área circular. Rodeando a éstos, se observa un grupo de blastómeros periféricos. Estos últimos aparecen limitados por un borde regular, muy cerca se observa otro borde de límite irregular, el área entre estos dos bordes corresponde al periblasto (Figura 4F). El periblasto es el área sincitial, de citoplasma continuo, del borde del blastodermo (Nelsen, 1953). Lagler (1970) lo define como una capa sincitial transitoria que se extiende sobre el vitelo junto con la extensión del blastodermo y está destinada a ser la envoltura de la masa vitelina. Su función es importante ya que es el contacto entre el área blastodérmica con los elementos nutritivos de la región vitelina. Ballard (1973a), lo describe en el desarrollo embrionario de *Salmo gairdneri* Richardson, como una corona que se extiende más allá del borde del blastodisco y que se observa particularmente cuando se aplica

fijador a los embriones. Coincidimos con esta observación de Ballard, ya que igualmente en las blástulas fijadas en formalina de *B. australis* es más notoria esta estructura.

En el área vegetativa pueden verse alrededor de 20 glóbulos de aceite. Hay blástulas en las cuales estas gotas lipídicas se han unido para formar una gota oleosa de mayor tamaño como se observa en la microfotografía de la Figura 3C.

## II. Período de los movimientos morfogenéticos

Este período se caracteriza por movimientos epibólicos del blastodermo (Long y Ballard, 1966; Long, 1984) formándose el anillo germinal y el escudo embrionario (Tabla 3).

Estado 7. Blastodermo expandido (24-30 horas) (Figura 5A). Alrededor de 24 horas postfecundación se observa el inicio de los movimientos epibólicos que se traducen en una extensión del blastodermo sobre el vitelo. El blastodermo se adelgaza y se extiende como un casquete desde el polo animal hacia el ecuador del huevo, llegando a cubrir más de un tercio de él.

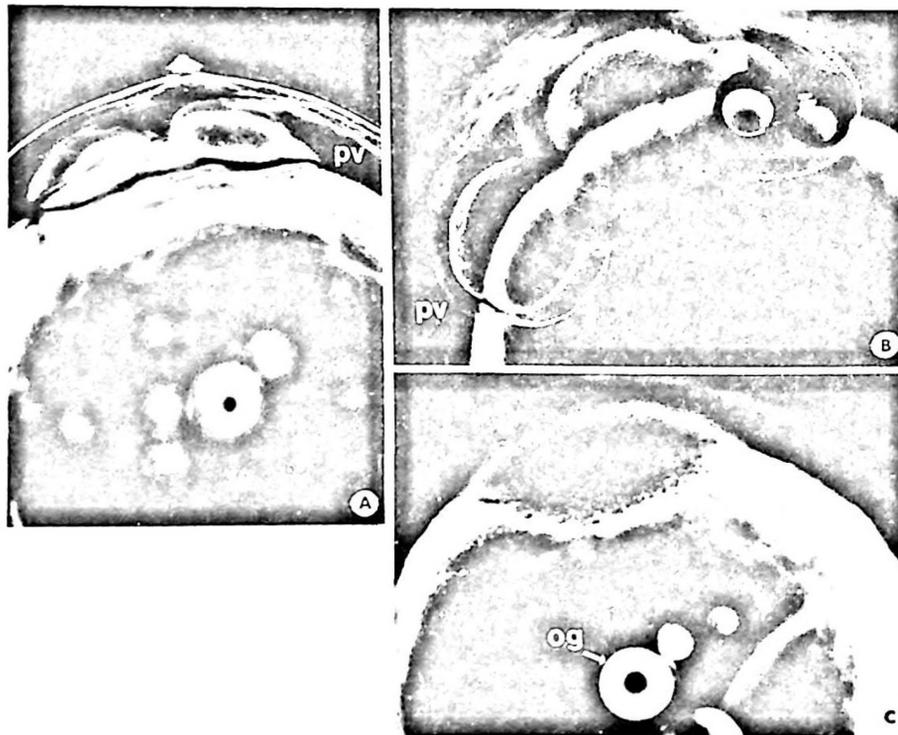


Figura 3

Microfotografías de campo obscuro de embriones de los estados de dos blastómeros (A), cuatro blastómeros (B) y mórula (C). Con este tipo de observación se destaca la forma y el volumen en el área de segmentación. 100x.

pv = espacio perivitelino, og = gota oleosa

En general en este estado, y en el anteriormente descrito, se aprecia una rotación del embrión dentro del corion, pues, el área del blastodermo queda desplazada con respecto a la ubicación del micrópilo. En algunas oportunidades es posible ver los filamentos coriales en la zona del ecuador del embrión.

Estado 8. Anillo germinal (30-50 horas) (Figura 5B). En este estado se pueden observar dos áreas, una marginal que corresponde al anillo germinal, que se muestra como una banda sobre el ecuador del huevo y un área clara central delimitada por este anillo germinal. Según Long (1984), la formación del anillo germinal en teleósteos se produce por una acumulación de células profundas en el margen del blastodisco cuando comienzan los movimientos epibólicos.

Pronto aparece en una zona del borde interno de este anillo un engrosamiento que aumenta de tamaño por agregación de células. Estas células comienzan a desplazarse hacia lo que será la futura región cefálica. La orientación de este grupo de células es perpendicular a la del anillo germinal (Figura 5B). Esta situación nos está indicando la diferenciación de un eje anteroposterior del futuro embrión.

Algunos embriones, 30 horas post-fecundación, todavía están al estado de mórula, notándose la pérdida de sincronía en el desarrollo. Esta asincronía ha sido observada durante el desarrollo de otros teleósteos (Saksena *et al.*, 1961; Wourms, 1972; Luchini y Cruz, 1981) y en el desarrollo de invertebrados como la sanguijuela (Fernández, 1980).

Estado 9. Escudo embrionario (50-72 horas) (Figura 5C). Entre el segundo y tercer día de incubación aumenta el número de células con orientación anteroposterior perpendicular al anillo germinal, formando una cuña o escudo con una banda en el centro que se proyecta hacia el extremo anterior del embrión y que constituirá posteriormente la región cefálica.

La formación de este escudo embrionario ha sido explicado por movimientos de convergencia de las células del anillo germinal en un punto del mismo (Ballard, 1973b; Long, 1984), lo que permite señalar en este estado la orientación del futuro embrión, correspondiendo este punto al extremo posterior; según Long y Speck (1984) el escudo embrionario visible marca el plano de simetría bilateral.

Los posibles mecanismos que llevan a la formación del escudo embrionario en un punto del anillo germinal están señalados por Long (1984) en un modelo computarizado, apoyado en el tipo de movimientos de las células de la blástula. En ésta, las células profundas del centro del blastodisco tienden por epibolia a desplazarse hacia los bordes. Las células que están en el borde del blastodisco convergen hacia la línea media dorsal y hay células que pueden detener sus movimientos por una barrera física tanto del borde del blastodermo como por los grupos celulares de mayor densidad en los que se dificulta el movimiento.

La formación del engrosamiento interno del anillo germinal y del escudo embrionario en *B. australis*, semeja a lo que ocurre en el estado 11 del desarrollo embrionario normal de *Catostomus commersoni* descrito por Long y Ballard (1976) y a los estados 7 al 11 del desarrollo de salmónidos (Ballard, 1973a).

Estado 10. Placa neural (72-86 horas). Ya en el tercer día de incubación, la migración de células en el escudo embrionario hacia el extremo anterior es más marcada, formándose la placa neural ensanchada de la región cefálica que va a originar más adelante las vesículas encefálicas. Por debajo de la región cefálica se ubica una gota de aceite de aproximadamente 0,2 mm de diámetro formada por la confluencia de gotas más pequeñas observadas en estados anteriores. También es posible observar en algunos embriones el surco de formación de los primeros somitos. En la región posterior del embrión se aprecia el blastoporo con el tapón vitelino, representado en el esquema de la Figura 5D.

### III. Período de organogénesis

Estado 11. Formación de vesículas encefálicas (86-100 horas). Entre el tercero y cuarto día de incubación, se forman en la región cefálica vesículas encefálicas engrosadas, la más anterior que constituye el cerebro anterior o prosencéfalo es más estrecho en este estado que el cerebro medio o mesencéfalo, el cual se ve más dilatado. La vesícula más posterior desarrollada es el cerebro posterior o rombencéfalo observadas en el dibujo esquemático de la Figura 5E. Tempranamente hacen su aparición las vesículas ópticas como proyecciones laterales ovaladas del cerebro anterior. En el tronco se ven cuatro a seis somitos.

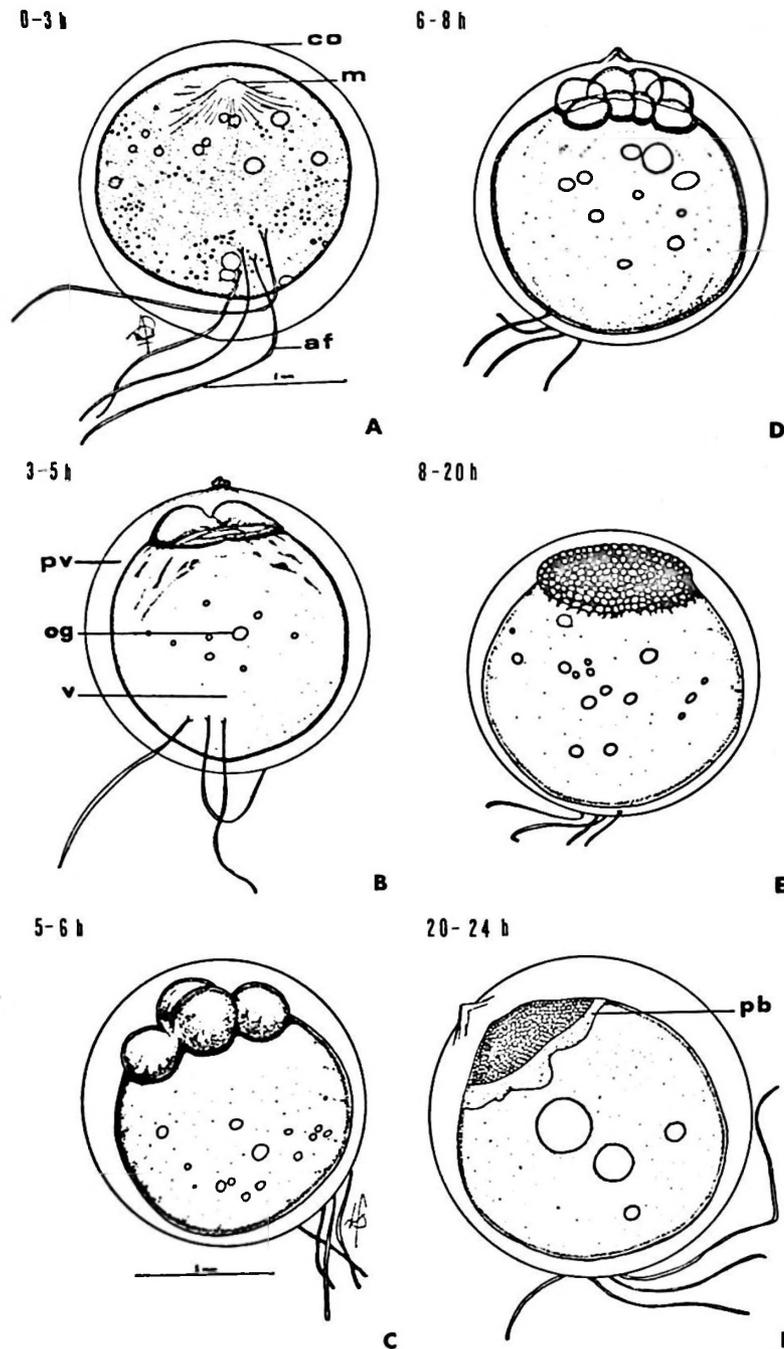


Figura 4. Representación esquemática del huevo y de estados de segmentación de *B. australis* incubados a temperatura de laboratorio (14°-22°C).

- A. Huevo fecundado indiviso, se observan el corion (co), los filamentos adhesivos (af) y el micrópilo (m).
- B. Estado de dos blastómeros, estas células se observan proyectándose hacia el espacio perivitelino (pv), por debajo de ellas el vitelo (v) contiene numerosas gotas oleosas (og).
- C. Estado de cuatro blastómeros, también estas células se expanden hacia el espacio perivitelino y su forma es globosa.
- D. Estado de ocho blastómeros, es menor la expansión hacia el espacio perivitelino persistiendo el aspecto globoso.
- E. Mórula: la disminución de tamaño de los blastómeros derivada de las divisiones celulares hace menos aparente esta proyección hacia el espacio perivitelino observada en los estados anteriores.
- F. Blástula, es difícil reconocer los límites celulares, el borde externo corresponde al periblasto (pb), las gotas de aceite se fusionan formándose glóbulos oleosos de mayor tamaño.

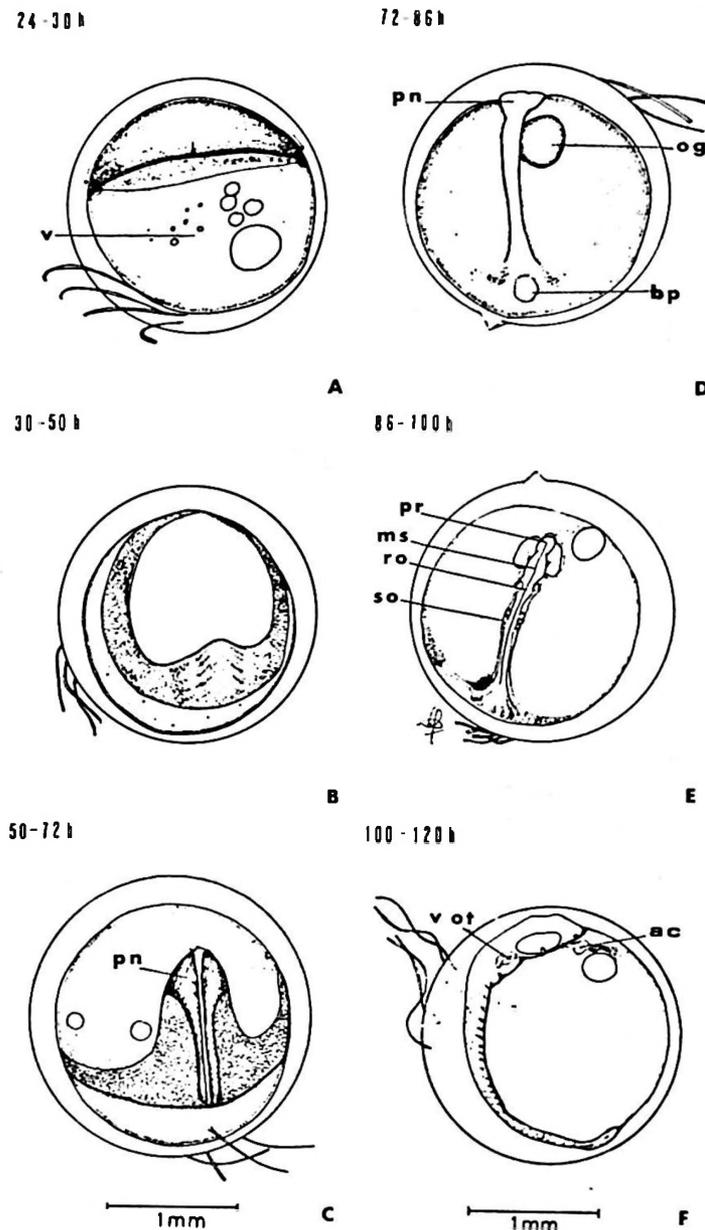


Figura 5. Representación esquemática del desarrollo embrionario desde la expansión del blastodermo hasta el estado 12, en el cual se observan los primeros movimientos del corazón.

- A. Blastodermo expandido: Las células de la blástula comienzan a migrar en dirección del ecuador, formándose un casquete de células embrionarias por sobre el vitelo (v).
- B. Anillo germinal: Los movimientos celulares característicos del período de gastrulación, permiten la formación de una banda de células de disposición supraecuatorial que delimitan un área central clara. Esta banda corresponde al anillo germinal, en el cual hay un grupo de células que convergen hacia una zona que determinará la región anterior del futuro pez.
- C. Escudo embrionario: Es el área de convergencia celular con orientación anteroposterior, en la región más anterior se comienza a originar la placa neural (pn).
- D. Placa neural (pn): Parte engrosada de células de la región anterior del embrión. La gota oleosa (og), ahora única se ubica por debajo de la placa neural. El blastoporo (bp) está limitando la región más caudal del embrión.
- E. Vesículas encefálicas: Se observan las tres vesículas primarias, cerebro anterior (pr), medio (ms) y posterior (ro), además de las vesículas ópticas (vo) que constituyen proyecciones laterales del cerebro anterior. Se ven también los primeros somitos (so).
- F. Primeros movimientos del corazón: Puede verse el área cardíaca (ac) por delante de la región cefálica, el corazón observado *in vivo*, manifiesta latidos que impulsan la sangre hacia el cuerpo del embrión.

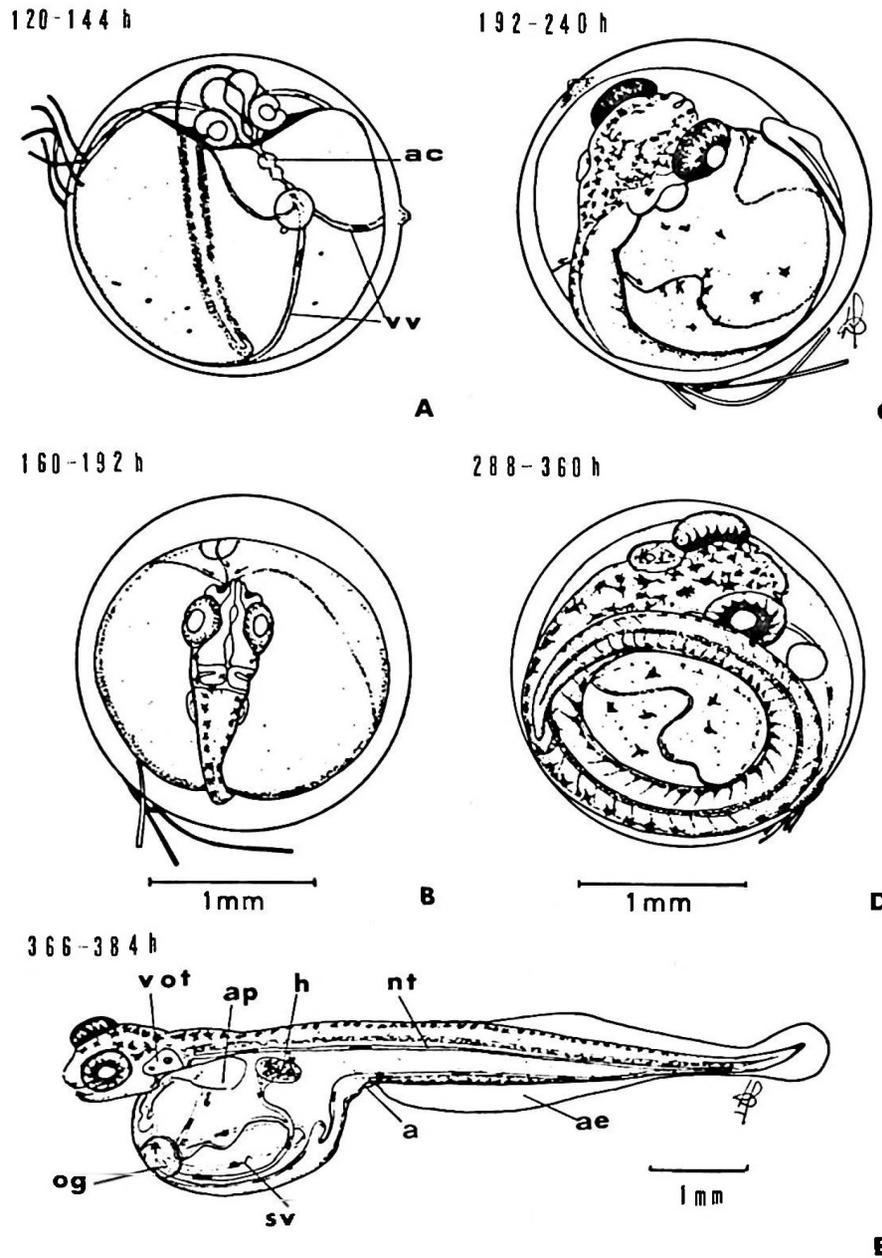


Figura 6. Representación esquemática de los estados del desarrollo desde circulación vitelina hasta larva recién eclosionada.

- A. Circulación vitelina, son notorias las venas vitelinas (vv) derecha e izquierda que se dirigen con un flujo sanguíneo hacia el área cardíaca (ac). Un tercer vaso desde la región caudal del embrión también viene a desembocar en el corazón. Las flechas indican el sentido de la circulación.
- B. Pigmentación ocular y dorsal, comienza la pigmentación de ellos, por detrás de los ojos y a ambos lados del cuerpo se desarrollan melanóforos estrellados.
- C. Movimientos corporales, se observan en vivo. Se nota un crecimiento del embrión y se pigmenta la región cefálica dorsal.
- D. Elongación del embrión, se hace evidente con el enrollamiento del embrión sobre sí mismo.
- E. Larva recién eclosionada. En el esquema se observa la forma general de la larva que eclosiona con gran cantidad de pigmentación. Externamente se visualiza la aleta pectoral (ap) y entre el saco vitelino (sv) y la aleta embrionaria (ae), la abertura anal (a). Además puede observarse por transparencia la vesícula ótica (vot), el hígado (h), el glóbulo de aceite (og) y la notocorda (nt).

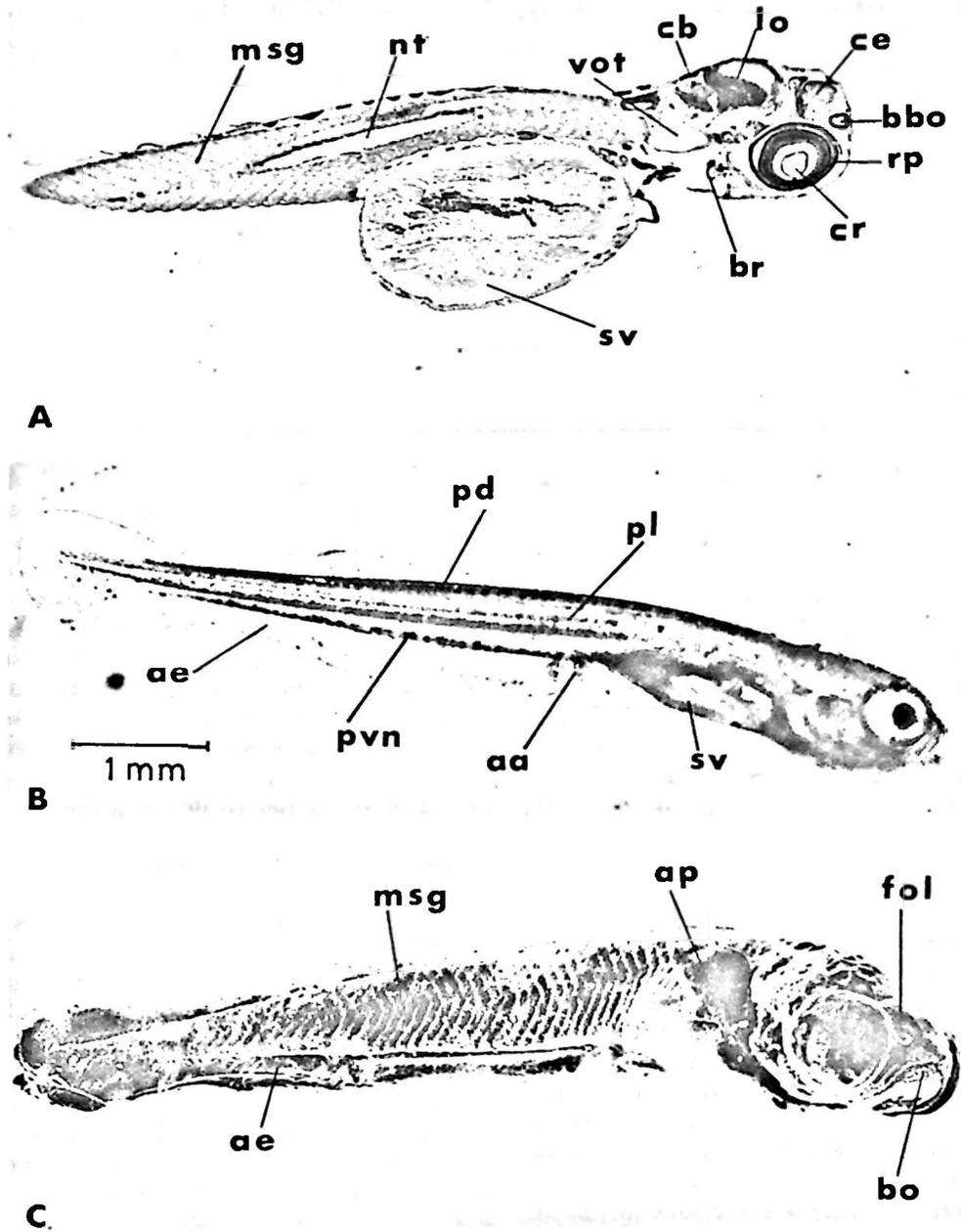


Figura 7. Microfotografías de prelarvas con tres métodos diferentes de observación.

A. Corte histológico longitudinal de larva recién eclosionada. Se observa en la región troncal la musculatura segmentada (msg), saco vitelino (sv), notocorda (nt). En la región cefálica vemos el bulbo olfatorio (bbo), cerebro (ce), lóbulo óptico (lo), cerebelo (cb). En los ojos se destacan la retina pigmentada (rp) y el cristalino (cr). Por efecto del corte la vesícula ótica aparece vacía (v ot).

B. Prelarva observada en vivo alrededor de 48 horas después de eclosionar, la abertura anal (aa) se ubica entre la aleta embrionaria (ae) por detrás del saco vitelino (sv). Se visualizan además tres corridas de pigmentos, dorsal (pd), lateral (pl) y ventral (pvn).

C. Con microscopía de barrido es posible analizar cuantitativamente la musculatura segmentada (msg). En la región cefálica es posible observar fosa olfatoria (fol), posición y magnitud que alcanzan los ojos (oj) y la boca (bo). La aleta embrionaria (ae) y la aleta pectoral, presentan artefactos de técnica relativos a su fragilidad como puede apreciarse en B.

**TABLA 1**  
**Alteraciones del desarrollo de *B. australis* detectadas al examen de una muestra de 193 huevos fecundados y cultivados en condiciones de laboratorio.**

	Nº de huevos	% de huevos
Huevos citolisados y muertos por contaminación	30	15,53
Embriones anormales	5	2,59
Embriones que alcanzaron el estado de prelarvas	158	81,86
<b>TOTAL</b>	<b>193</b>	<b>100,00%</b>

Estado 12. Primeros movimientos del corazón (100-120 horas). Entre el cuarto y quinto día de incubación se observa un mayor desarrollo de las vesículas encefálicas y ópticas, visualizándose el cristalino (Figura 5F). Son notorias también las cápsulas olfatorias y las vesículas óticas. Ha aumentado el número de somitos y se observan los primeros movimientos del corazón ubicado por delante de la región cefálica.

Estado 13. Circulación vitelina (120-144 horas). A los seis días de incubación, se nota un mayor desarrollo del cerebro medio y se ha desarrollado el cerebelo (Figura 6). Las cápsulas ópticas aparecen levemente pigmentadas. Por detrás de los ojos, se han desarrollado cápsulas óticas. En el saco vitelino se observa la circulación de la sangre por las venas vitelinas derecha e izquierda, cuyo flujo se dirige hacia el corazón embrionario donde se perciben notoriamente los latidos cardíacos.

Estado 14. Pigmentación ocular y dorsal (160-192 horas) (Figura 6B). Entre el séptimo a octavo día de incubación, se nota un aumento de tamaño del embrión. En los ojos, el cristalino ya está incluido en las copas ópticas y la pigmentación es más evidente. Por la pigmentación y el brillo, los ojos son muy buenos indicadores de si el embrión está vivo, lo que constituye una característica útil e importante en acuicultura para detectar y extraer tempranamente los embriones sin vida. El resto de la pigmentación corporal también se acentúa, hay dos bandas de pigmentos con melanóforos de tipo estrellado por detrás de los ojos que convergen en la línea

media por detrás de las vesículas óticas para continuar hacia la región caudal en una banda de pigmentos cubriendo hacia atrás dos tercios del cuerpo. Hay también algunos melanóforos distribuidos en el saco vitelino.

En las vesículas óticas es posible visualizar en este estado un par de otolitos en cada una.

Las aletas pectorales emergen como pequeñas proyecciones laterales por detrás y ventral a las vesículas óticas.

Estado 15. Movimientos corporales del embrión (192-240 horas) (Figura 6C). Hacia el décimo día de incubación continúa el aumento progresivo de tamaño del embrión así como de su pigmentación. La aleta caudal alcanza a tocar la cabeza rodeando así el saco vitelino. El extremo caudal de la cola se separa del saco vitelino quedando libre. Se aprecian además notorios movimientos corporales del embrión dentro del corion.

Estado 16. Movimientos de ojos y mandíbulas (240-288 horas). Entre los diez y doce días de incubación comienzan los movimientos del globo ocular y movimientos de apertura y cierre de la boca. Aumenta la longitud de los embriones llegando el extremo posterior a sobrepasar la cabeza. Las venas vitelinas se ven más acodadas. La pigmentación es más profusa y ha avanzado hasta el morro en la región cefálica.

Estado 17. Elongación del embrión (288-360 horas). Entre el decimotercero y el decimoquinto día de incubación hay un aumento de tamaño total del embrión a expensas del vitelo, llegando a enrollarse sobre sí mismo (Fi-

gura 6D). El pigmento del dorso toma una disposición especial sugiriendo que a cada segmento correspondiera un melanóforo estrellado. Se intensifican los movimientos del embrión dentro del corion y los movimientos de las mandíbulas, pareciendo que éstas ayudan a raspar el interior del corion, ocasionando un adelgazamiento de esta membrana, lo que favorecerá la eclosión de la prelarva.

Estado 18. Eclosión (336-384 horas). Hay un intervalo de tiempo más o menos amplio en que las larvas eclosionaron, aunque la mayoría lo hicieron después de los quince días de incubación. La excepción la constituyó un grupo de huevos dejados para observación sin oxigenar, que nacieron a los 14 días en su totalidad.

Antes de eclosionar, los embriones experimentan movimientos de rotación dentro del corion, estos movimientos son impulsivos y arrítmicos. Hay un adelgazamiento del corion, probablemente aumenta la permeabilidad de esta membrana protectora, aumen-

tando el volumen de líquido en el interior y como consecuencia se produce una ruptura en la zona más delgada, por ella emerge en primer lugar el extremo caudal de la prelarva, los movimientos se intensifican para tratar de desalojar la región cefálica que ha quedado encapuchada por el corion. Una vez que se ha desprendido completamente de la membrana que la envolvía, se desplaza con movimientos natatorios en la cápsula de cultivo y pareciera esforzarse en mantener su saco vitelino que la lleva un poco a fondo.

#### Larva recién eclosionada o prelarva (Figuras 6E y 7A)

Tiene alrededor de 8 mm de longitud total (LT) y está entre las de mayor tamaño comparando la longitud de eclosión de otras especies de aterínidos (Tabla 3). En la región cefálica los ojos son grandes, prominentes, la boca terminal, se aprecian movimientos de las mandíbulas. Por detrás de los ojos se ven las cápsulas óticas y por transparencia dentro de ellas, un par de otolitos de diferente tama-

TABLA 2

#### Estados y tiempo de desarrollo de *B. australis* (14 - 22°C)

Estado	Tiempo	Características
1	0 - 3 hrs	Huevo indiviso
2	3 - 5 hrs	2 blastómeros
3	5 - 6 hrs	4 blastómeros
4	6 - 8 hrs	8 blastómeros
5	8 - 20 hrs	Mórula
6	20 - 24 hrs	Blástula
7	24 - 30 hrs	Blastodermo expandido
8	30 - 50 hrs	Anillo germinal
9	50 - 72 hrs	Escudo embrionario
10	72 - 86 hrs	Placa neural
11	86 - 100 hrs	Vesículas encefálicas y primeros somitos.
12	100 - 120 hrs	Primeros movimientos del corazón
13	120 - 144 hrs	Desarrollo de circulación vitelina.
14	160 - 192 hrs	Pigmentación ocular y corporal dorsal, desarrollo de las aletas pectorales.
15	192 - 240 hrs	Comienzan movimientos corporales del embrión.
16	240 - 288 hrs	Comienzan movimientos oculares y mandibulares.
17	288 - 360 hrs	Elongación del embrión y enrollamiento sobre sí mismo. Intensificación de los movimientos rotatorios dentro del corion.
18	336 - 384 hrs	Eclosión

TABLA 3

Comparación de datos morfométricos, tiempo y temperatura de incubación en el desarrollo embrionario de siete especies de aterínidos, incluyendo *B. australis*.

Especie	Diámetro del huevo (mm)	Temperatura de incubación (°C)	Duración del período de incubación	Longitud de eclosión de la prelarva	Referencias
<i>Odontesthes bonariensis</i>	1,6	15 - 21	10 días	—	González y Mastrarrigo, 1948
<i>O. (Austromeniidia) regia</i>	1,35-2,0	20 - 22	12-14 días	5 - 7 mm	Chirinos y Chuman, 1964
<i>Odontesthes debueni</i>	1,65-1,86	—	—	5,5 - 7 mm	Fischer, 1963
<i>O. regia laticlavia</i>	1,8 -2,15	—	—	6 - 7 mm	Fischer, 1963
<i>Labidesthes sicculus</i>	1,1 -1,4	—	—	5,3 mm	Rasmussen, 1980
<i>Membras vagrans</i>	0,9 -0,94	—	—	3-3,5 mm	Flores-Coto, 1983
<i>Basilichthys australis</i>	1,7 -2,4	14 - 22	15 días	~ 8 mm	Datos del presente trabajo

ño en cada una. Los de mayor tamaño corresponden a los "sagittae". El otolito más pequeño de cada cápsula corresponde al "lapillus". La pigmentación bastante profusa, alcanza hasta el reborde de la maxila en el extremo anterior. Hacia atrás por sobre la región cefálica y troncal, la pigmentación se extiende sobre el eje axial. También se disponen dos bandas de pigmento a ambos lados del cuerpo y una longitudinal a ambos lados de la aleta ventral (Figura 7B).

Las aletas pectorales presentan seis a siete rayos. La aleta embrionaria dorsal única se extiende hasta la caudal, continuándose en la aleta ventral hasta la desembocadura del ano (Figura 7B).

En cortes histológicos longitudinales es posible observar la disposición de la musculatura segmentada troncal interrumpida por la notocorda y el tubo neural cuando la sección pasa por el plano sagital. Sin embargo, su cuantificación se dificulta, porque no tenemos la seguridad de tener exactamente el corte longitudinal completo. Con microscopía de barrido observada en la Figura 7C, ha sido posible contabilizar alrededor de 50 miómeros.

El saco vitelino es prominente en la región ventral, presentando aún una gota oleosa y pigmentos en la superficie dorsal. Se reduce entre tres a cuatro días de desarrollo larval. El estado larval resultante después de la reabsorción del vitelo ha sido denominado por algunos autores como postlarva (Lagler, 1970). Aunque estas larvas aún mantienen

sus características que las hacen diferentes de un individuo juvenil.

Con la reducción del saco vitelino se estiliza la figura de la larva. La aleta dorsal comienza a diferenciarse, la región del pedúnculo se hace más angosta desde donde nace la aleta caudal, que se presenta redondeada y con desarrollo de rayos caudales.

## DISCUSION

Uno de los problemas que llama la atención y preocupa por los aspectos prácticos que involucra, es el comportamiento de las hembras traídas desde el ambiente natural con el propósito de provocar su desove en el laboratorio. El desove no siempre se obtuvo con facilidad, aun cuando las hembras tuvieran manifiestas características indicadores de maduración gonadal, hubo especímenes que no desovaron. Es necesario buscar las causas de este comportamiento diferente entre las hembras.

Se conoce bien que son los estímulos ambientales (fotoperíodo, temperatura, pluviosidad), los que desencadenan los eventos reproductivos en peces, provocando, después del paso de la información a centros neurales, la liberación de gonadotrofinas hipofisarias que estimulan la producción de esteroides sexuales en la gónada, los que serán responsables de la maduración de los ovocitos (Hoar y Randall, 1969; Harvey y Hoar, 1980). Estos autores señalan también que las etapas finales del desarrollo de los ovocitos y

foliculos pueden disociarse experimentalmente de la ovulación, es decir, puede haber ovocitos en etapas finales de maduración, pero no cumplirse las condiciones necesarias para que se desencadene la ovulación (expulsión del ovocito fuera del foliculo) y el desove (oviposición al medio ambiente). Estas condiciones serían independientes del control hipofisiario a criterio de Harvey y Hoar (1980), sin embargo, Stacey *et al.* (1984), demuestran el aumento de las gonadotropinas plasmáticas en el momento de la ovulación y durante el desove natural de *Catostomus commersoni* y citan a muchos autores que concuerdan que en una gran variedad de peces teleosteos las gonadotropinas plasmáticas aumentan dramáticamente al momento de la ovulación y el desove.

Si en la práctica hay algunos especímenes de *B. australis* que desovan es posible pensar que los que no lo hacen es porque aún no han completado la maduración ovocitaria, o bien habiéndose completado, habría una inhibición de la descarga ovulante de la hormona luteinizante (LH) frente a las condiciones temporales de cautiverio. Es posible entonces que sea la falta de estímulos ambientales o las condiciones de stress sufridas en cautiverio, o la adición de ambas causales las que podrían estar inhibiendo la descarga hormonal que desencadena el desove en especies silvestres no acostumbradas aún a confinamiento.

Por su tamaño y transparencia es posible visualizar con claridad las etapas del desarrollo embrionario en huevos de *Basilichthys australis*. Se constató una duración del periodo de incubación desde la fecundación del ovocito, hasta la eclosión de la prelarva de  $15 \pm 1$  día a temperaturas entre 14-22°C, determinándose 18 estados.

Podemos comparar el desarrollo ontogénico de esta especie en sus aspectos morfológicos generales con la de otros aterínidos descritos por Fischer (1963), Chirinos y Chuman (1964), Rasmussen (1980), y observamos bastante similitud. Sin embargo, no es posible hacer comparaciones relativas al periodo de incubación y número de estados del desarrollo de peces, ya que no son comparables en la mayoría de los casos las metodologías y objetivos de estudio de los diferentes autores, esto se desprende de la confrontación de los datos señalados por diferentes autores para siete especies de aterínidos (Tabla 3). Fischer (1963) y Rasmussen (1980), estudia-

ron muestras de huevos obtenidos desde el ambiente natural, sin conocer exactamente el momento de la fecundación, por consiguiente sin hacer referencia a la duración de los estados ni al periodo de incubación. Long y Ballard (1976) en un prolijo estudio del desarrollo de *Catostomus commersoni* describen 21 estados desde el huevo fertilizado e indiviso hasta la eclosión, a temperaturas constantes diferentes (entre 10° y 20°C), en condiciones experimentales, sin el corion.

Como afirma Chirinos y Chuman (1964) el periodo de incubación es variable, de acuerdo con las especies. Entre los aterínidos de aguas templado-frías, *Menidia* eclosiona alrededor de los 16 días a temperaturas entre 12° y 18°C; *Odontesthes (Austromenidia) regia regia* entre los 12 y 14 días a temperaturas alrededor de 20°C y *O. bonariensis* a los 10 días en rangos de temperaturas de 15° a 20°C. Las especies que, como los salmónidos, se desarrollan en aguas frías (5°-10°C) tienen un periodo de incubación más extenso, alrededor de 60 días y, por contrario, especies de aguas templadas (24°-28°C) tienen periodos de incubación muy cortos entre 24 a 28 horas. Entre estas últimas podemos citar como ejemplo el "bagre negro" *Rhamdia sapo* que eclosiona a las 30 horas de incubación a temperaturas entre 24° a 25°C (Luchini y Cruz, 1981). Teniendo en cuenta la importante influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario de peces, la cual al aumentar puede acelerar los procesos del desarrollo dentro de ciertos límites, es necesario a futuro relacionar el tiempo de incubación con el grado térmico acumulado por los huevos, con el fin de obtener un índice de unidades térmicas de incubación para esta especie si pretendemos su cultivo. Nos parece necesario destacar que éste puede llegar a ser un provechoso recurso proteico de alternativa al desarrollarse estudios de cultivo y manejo de la especie.

Finalmente nos atrevemos a sugerir que los huevos, embriones y larvas de *B. australis*, por las características ya analizadas, constituyen un material de gran utilidad en las prácticas demostrativas de embriología de peces.

**Anexo: Análisis de varianza para un grupo de 755 huevos de *B. australis* divididos en tres muestras obtenidas a distintos tiempos.**

El análisis se realizó para comprobar si

existían diferencias entre promedios del diámetro en 312 ovocitos recién desovados, 93 huevos fecundados y en división (1 a 24 horas) y 350 huevos con embriones en desarrollo después de las 24 horas hasta 14 días de incubación. Si la hipótesis es afirmativa y hay

diferencias de diámetros nos permite inferir que hay aumentos del diámetro de los huevos con embriones a mayor cantidad de tiempo de incubación.

Los datos de las 3 muestras se consignan en la siguiente tabla:

d	f	yi	yx <sub>d</sub>	d	f	yi	yx <sub>d</sub>	d	f	yi	yx <sub>d</sub>
1,6	( 3)	4,8	7,68	1,9	( 2)	3,8	7,22	1,8	( 1)	1,8	3,24
1,7	( 42)	71,4	121,38	2,0	(11)	22,0	44,0	1,9	—	—	—
1,8	(104)	187,2	336,96	2,1	(26)	54,6	114,66	2,0	( 9)	18,0	36,0
1,9	( 71)	134,9	256,31	2,2	(37)	81,4	179,08	2,1	( 8)	16,8	35,28
2,0	( 54)	108,0	216,0	2,3	(17)	39,1	89,93	2,2	(163)	358,6	788,92
2,1	( 33)	69,3	145,53					2,3	(167)	384,1	883,43
2,2	( 5)	11	24,2					2,4	( 2)	4,8	11,52
	312	586,6	1.108,66		93	200,9	434,89		350	784,1	1.758,39

Se obtuvieron los siguientes promedios:

Muestra X<sub>1</sub> = 1,88  
 X<sub>2</sub> = 2,16  
 X<sub>3</sub> = 2,24

Donde: d = diámetro  
 f = frecuencia  
 yi = d × f

Resumen de datos

		Σx	Σx <sup>2</sup>
Muestra 1	312	586,6	1.108,06
Muestra 2	93	200,9	434,89
Muestra 3	350	784,1	1.758,39
Total	755	1.571,6	3.301,34

FC = 3.271,43

Tabla de ANOVA

F. Var.	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.
Trat.	22,05	2	1,1025	1,050
Error	7,86	752	0,0105	
Total	29,91	754		

Las diferencias entre los 3 promedios fueron significativas (p < 0,01)

Prueba de Scheffé

Se aplicó para comparar cada una de las medias entre sí y ver si entre ellas había diferencias significativas de diámetro.

Comparación entre 1ª muestra y 2ª muestra.  
 X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub>

$$\sqrt{0,0105 \left( \frac{1}{312} + \frac{1}{93} \right)} \cdot \sqrt{4,6 \cdot 2}$$

0,01211 · 3,033 = 0,036

0,28 > 0,036 ⇒ hay ≠ significativa al 1%

Comparación entre 1ª y 3ª muestra  
 X<sub>1</sub> - X<sub>3</sub>

$$\sqrt{0,0105 \left( \frac{1}{312} + \frac{1}{350} \right)} \cdot 3,033$$

0,00798 · 3,033 = 0,0242

0,36 > 0,242 ⇒ hay ≠ significativa al 1%

Comparación entre 2ª y 3ª muestra  
 X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub>

$$\sqrt{0,0105 \left( \frac{1}{93} + \frac{1}{350} \right)} \cdot 3,033$$

0,01195 · 3,033 = 0,036

0,08 > 0,036 ⇒ también hay diferencias significativas.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer al Dr. Juan Fernández y Dr. Jorge Arrau, la revisión del manuscrito y sus valiosas sugerencias. Al profesor Harald Schmidt, la traducción del texto de Fischer. Al personal de microscopía electrónica de IDIEM. A la Dra. M. Angélica Marles su colaboración en el análisis estadístico. A la señora Carmen Graff las mediciones de ovocitos y embriones en la primera etapa del

trabajo. Al señor Alejandro Miranda por la preparación del material fotográfico y al señor Fermín Camilo por su ayuda en la recolección de muestras en terreno y mantención de acuarios en el laboratorio.

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo parcial de los proyectos B-1551-8213, 8323, 8433 y 8544 del Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile.

## REFERENCIAS

- BAHAMONDES, I.; D. SOTO e I. VILA. 1979. Hábitos alimentarios de los pejerreyes (Pisces Atherinidae) del Embalse Rapel. Chile. Medio Ambiente 4(1): 3-18.
- BALLARD, W.W. 1973a. Normal embryonic stages for Salmonid fishes based on *Salmo gairdneri* Richardson an *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). The Journal of Experimental Zoology, 184: 7-26.
- BALLARD, W.W. 1973b. Morphogenetic movements in *Salmo gairdneri* Richardson. The Journal of Experimental Zoology, 184: 27-48.
- CAMPOS, H. 1972. Breeding season and early development of *Brachygalaxias bullocki* (Osteichthyes: Galaxiidae). The Texas Journal of Science, 23 (4): 531-544.
- CERISOLA, H.; F. GRISOLIA y E. MÉNDEZ. 1978. Aspectos estructurales y ultraestructurales del ovario del pejerrey de agua dulce *Basilichthys australis* Eigenmann. Anales del Museo de Historia Natural, Valparaíso, 11: 175-190.
- CHIRINOS DE V., A. y D.E. CHUMAN. 1964. Notas sobre el desarrollo de huevos y larvas del pejerrey *Odonthestes (Austromeniida) regia regia* Humboldt. Boletín del Instituto del Mar del Perú, 1(1): 1-31.
- DE BUEN, F. 1940. Huevos, crías, larvas y jóvenes de *Chirostoma* del lago Pátzcuaro. Estación Limnológica de Pátzcuaro. Trabajo N° 3: 1-14.
- DUARTE, W.; R. FEITO; C. JARA; C. MORENO y A.E. ORELLANA. 1971. Ictiofauna del sistema hidrográfico del río Maipo. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Chile, 32: 227-268.
- FERNÁNDEZ, J. 1980. Embryonic development of the Glossiphoniid leech *Theromyzon rude*: Characterization of developmental stages. Developmental Biology, 76: 245-262.
- FISCHER, W. 1963. Die Fische des Brachwassergebietetes Lenga bei Concepción (Chile). Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie, 48 (3): 419-511.
- FLORES-COTO, C. 1983. Descripción del huevo y el desarrollo larvario de *Membras vagrans* (Goode y Bean) con notas sobre su época de desove en la laguna de Tamiahua, Veracruz. (Pisces: Atherinidae). Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 10 (1): 237-248.
- GAJARDO, G. y G. ARRATIA. 1980. Aspectos sistemáticos de *Basilichthys* en Chile (Peces: Atherinidae). Archivos de Biología y Medicina Experimental, Sociedad de Biología de Chile, 13(1): R-140.
- GONZÁLEZ, T. y V. MASTRARRIGO. 1948. Piscicultura del pejerrey. Dirección de Piscicultura, Pesca y Caza Marítima. Publicaciones Misceláneas.
- HARVEY, B. y W. HOAR. 1980. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Ottawa, Ontario. CIID. 48 p.
- HIRONAKA, L. 1978. Centros piscícolas estatales de Chile. Informe Servicio Nacional de Pesca.
- HOAR, W.S. y D.J. RANDALL. 1969. Fish Physiology. Vol. 3. Academic Press, New York and London.
- HUAQUIN, L. 1978. Un caso de embriones "siameses" en el pejerrey *Basilichthys australis* Eigenmann 1927 (Atherinidae). Ciencias Forestales, 1(2): 61-69.
- HUAQUIN, L. 1980. Filamentos coriales en ovocitos y huevos de *Basilichthys australis* Eigenmann 1927 (Osteichthyes: Atherinidae). Archivos de Biología y Medicina Experimental, Sociedad de Biología de Chile, 13(1): R-75.
- HUAQUIN, L. 1983. Embriones siameses de pejerrey chileno. Revista Creces, 4(4): 38-41.
- IWAMATSU, T. and H. KEINO. 1978. Scanning electron microscopic study on the surface change of eggs of the teleost, *Oryzias latipes*, at the time of fertilization. Development Growth & Differentiation, 20(3): 237-250.
- LAGLER, K.F. 1970. Freshwater fishery biology. W.M.C. Brown Company Publishers. Dubuque. Iowa. 421 p.
- LONG, W. 1984. Cells movements in teleost fish development. Bioscience, 34(2): 84-88.
- LONG, W.K. and W. BALLARD. 1976. Normal embryonic stages of the white sucker, *Catostomus commersoni*. Copeia, 2: 342-351.
- LONG, W.K. and N.A. SPECK. 1984. Determination of the plane of bilateral symmetry in the teleost fish, *Oryzias latipes*. The Journal of Experimental Zoology, 229: 241-245.
- LUCHINI, L. y C. CRUZ. 1981. Reproducción inducida y desarrollo larval del "bagre negro", *Rhamdia sapo* (Val) Eigenmann. Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral, 12: 1-7.
- MORENO, C.; R. URZÚA y N. BAHAMONDES. 1977. Breeding season, sexual rate and fecundity of *Basilichthys australis* Eigenmann 1927, from Maipo River, Chile (Atherinidae, Pisces). Studies on Neotropical Fauna and Environment, 12: 217-233.
- NELSEN, O. 1953. Comparative embryology of the Vertebrates. The Blakiston Company Inc. Toronto.
- RASMUSSEN, R.P. 1980. Egg and larval development of Brook Silversides from the Peace River, Florida. Transactions of the American Fisheries Society, 109: 407-416.
- RINGUELET, R. 1943. Piscicultura del pejerrey o Atherinicultura. Editorial Suelo Argentino, 6: 1-162.
- SAKSENA, V.; K. YAMAMOTO and C. RIGGS. 1961. Early development of the Channel catfish. The Progressive Fish Culturist, 23(4): 156-161.
- SOTO, D. 1978. Edad, crecimiento y ciclo reproductivo de *Basilichthys australis* (Pisces, Atherinidae) Eigenmann 1927 en el Embalse Rapel. Chile. 57 p., 21 fig. Tesis de grado. Licenciatura en Ciencias, Universidad de Chile, Fac. de Ciencias, Depto. de Biología. Santiago, Chile.
- STACEY, N.E.; D.S. MACKENZIE; T.A. MARCHANT; A.L. KYLE y R.E. PETER. 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. I. Gonadotropin, growth hormone, and thyroid hormones. General and Comparative Endocrinology, 56: 333-348.
- URZÚA, R.; C. DÍAZ; E. KARMY y C. MORENO. 1977. Alimentación natural de *Basilichthys australis* (Eigenmann) en Tejas Verdes, Chile (Atheriniformes, Atherinidae). Biología Pesquera, Chile, 9: 45-61.

VILA, I. and D. SOTO. 1981. Atherinidae (Pisces) of Rapel Reservoir, Chile. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 21: 1334-1338.

WOURMS, J. 1972. Development Biology of annual fishes. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. *The Journal of Experimental Zoology*, 182(2): 143-169.