

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CS. VETERINARIAS
ESCUELA DE ACUICULTURA.



TESIS DE GRADO

**Uso y comparación de tratamientos
profilácticos en ovas de *Galaxias
maculatus* (Jenyns, 1842), para mejorar la
sobrevivencia embrionaria a eclosión.**

Tesis de grado presentada
como parte de los
requisitos para optar al
grado de Licenciado en
Ciencias de la Acuicultura.

**Alumno: Juan Romero C
Profesor guía: Juan Barile S.**

TEMUCO CHILE.

2003.

RESUMEN.

En la presente investigación, fue evaluada la efectividad de 3 tratamientos profilácticos (sal de mar a 30 ppt, formalina a 250 ppm y yodo a 100 ppm), en ovas de puye (*Galaxias maculatus*), determinando si estos tratamientos mejoran la sobrevivencia embrionaria a eclosión. Los tratamientos, fueron aplicados a partir del estado de “ova con ojos” (ojos pigmentados), hasta antes de la eclosión, sometiendo las ovas a baños de aspersion, quedando húmedas, por 1 hora, realizándose el procedimiento cada dos días. El bioensayo, fue repetido 3 veces, en el mismo lapso de tiempo, en la sala de incubación de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco, Chile, desde el 26 de Oct. al 27 Nov. del 2001. Los resultados mostraron, en las 3 repeticiones, que la sal a 30 ppt obtiene los mejores rangos de sobrevivencia a eclosión ($90,40 \pm 6,22$ %; $97,20 \pm 2,68$ % y $96,80 \pm 5,63$ %, para cada bioensayo), en comparación a los otros tratamientos ($70,80 \pm 3,34$ %; $70,00 \pm 6,92$ % y $68,80 \pm 8,67$ %, para el yodo y $77,60 \pm 2,60$ %; $73,20 \pm 5,93$ % y $80,00 \pm 7,74$ %, para la formalina). Aunque, los tratamientos mejoran la sobrevivencia embrionaria, el tratamiento con sal, se diferencia significativamente ($p < 0.05$) en relación a los demás tratamientos profilácticos aplicados. Con respecto a la sobrevivencia larval de 15 días, las larvas nacidas de las ovas tratadas con sal, obtienen un $86,33 \pm 5,13$ %, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con los tratamientos de formalina ($70,66 \pm 3,05$ %), yodo ($58,33 \pm 5,68$ %) y control ($74,66 \pm 1,52$ %), indicando que la sal, no tiene incidencia en el desarrollo larvario. De acuerdo a esta investigación, el tratamiento de sal (30 ppt), es el más efectivo profiláctico en mejorar la sobrevivencia embrionaria. Además, el procedimiento de aplicación de los tratamientos, es de baja complejidad, estimando que su utilización es viable en ovas de *Galaxias maculatus*.

Palabras claves: Tratamiento profiláctico, “ova con ojos”, *Galaxias maculatus*, *Saprolegnia sp*, Reproducción, Incubación.

SUMMARY.

In this investigation, was evaluated the effectiveness of three prophylactics treatments of sea salt (30 ppt), formalin (250 ppm) and iodine (100 ppm), in eggs of whitebait (*Galaxias maculatus*), determine if that treatments improve the embryonic survivor to hatch. The treatments, was aplicated from state eyed eggs as before hatch, submity the eggs at spraying bath, remaining damp, for 1 hour, attainable this process every 2 days. The biotest, was repeated 3 times, in the same lapse of time, at the incubation room of the Aquaculture School, in the Catholic University in Temuco. Chile, since 26 Oct. to 27 Nov. 2001. The results showed, in the 3 biotest, that salt at 30 ppt get the best class of survivor to hatch (90.40 ± 6.22 %, 97.20 ± 2.68 % y 96.80 ± 5.63 %, for each biotest), in comparison at the others treatments (70.80 ± 3.34 %, 70.00 ± 6.92 % y 68.80 ± 8.67 %, for the iodine y 77.60 ± 2.60 %, 73.20 ± 5.93 % y 80.00 ± 7.74 %, for the formalin). Although, this treatments improve the embryonic survivor, the treatment with salt have significant differences ($p < 0.05$), in relation with the others prophylactics treatments aplicated. With regard to the fry survivor at 15 days, the fry born of the eggs treatise with salt get 86.33 ± 5.13 %, showed significant differences ($p < 0.05$), with the treatments of formalin (70.66 ± 3.05 %), iodine (58.33 ± 5.68 %) and control (74.66 ± 1.52 %), indicated that the salt, don't have incidence in the development of fry. In agreement at this investigation, the treatment of salt (30 ppt), is more effective prophylactic in improve the embryonic survivor. Besides, the process of application of the treatments, is low-complexity, estimating this use is viable in eggs of *Galaxias maculatus*.

Keywords: Prophylactic Treatment, "Eyed eggs", *Galaxias maculatus*, *Saprolegnia sp*, Reproduction, Incubation.

1.4.6	Otros químicos.	24
II.	OBJETIVO GENERAL.	26
2.1	Objetivos específicos.	26
2.2	Planteamiento de la hipótesis.	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.	27
3.1	Acondicionamiento de reproductores.	27
3.2	Desove de reproductores.	28
3.3	Diseño experimental.	29
3.3.1	Químicos utilizados.	29
3.3.2	Procedimiento de tratamiento.	29
3.3.2.a	Incubación.	29
3.3.2.b	Tratamientos.	31
3.3.3	Análisis estadístico.	33
IV.	RESULTADOS.	34
V.	DISCUSIÓN.	39
VI.	CONCLUSIONES.	43
VII.	BIBLIOGRAFÍA.	45

I. INTRODUCCIÓN.

Galaxias maculatus (Jenyns, 1842), es un pez nativo de distribución circumpolar, con poblaciones tanto de agua dulce como de agua salada. En Chile se encuentra en latitudes mayores a 30° LS, también se encuentra en el sur de Argentina, Islas Malvinas, sur de Australia, Tasmania y Nueva Zelanda. En nuestro país, el estado adulto recibe el nombre de "Puye" ó "Coltrao" (nombre mapuche) (Bariles, 1999).

La especie, se caracteriza morfológicamente por carecer de escamas, con una aleta dorsal desplazada hacia la región caudal y opuesta a la anal, su cuerpo es redondeado y en su dorso manchas oscuras (maculas) del cual debe su nombre (Vega, 1999) (Fig. 1).



Figura 1. Ejemplar adulto de puye (*Galaxias maculatus*), mantenida en condiciones de cultivo experimental.

En Chile, se reporta la existencia de dos poblaciones de puyes, que corresponden a las que realizan todo su ciclo de vida en agua dulce y las diadrómicas que realizan parte de su ciclo en agua dulce y parte en agua marina (catádomos). Ambas poblaciones, se diferencian entre sí por el número de vértebras (Campos, 1970).

Según Vega y col. (1995), dentro de su ciclo de vida, se pueden diferenciar los siguientes estadios:

- Ova verde.
- Ova embrionada (“ova con ojos”).
- Larva o alevín de saco.
- Cristalino.
- Adulto.

El estadio que presenta importancia comercial corresponde al ejemplar cristalino, el cual es considerado un fino plato de mesa con precios que fluctúan entre 50 y 80 dólares el kilogramo (Mardones y col., 1999).

El ejemplar cristalino, tiene un peso promedio de 0,3-0,4 g y 5 a 6 cm de longitud total, su cuerpo carece de pigmentación y tiene forma anguiliforme. En el caso de las poblaciones diadrómicas, los adultos desovan en terrenos inundables por las altas mareas, en donde los huevos se fijan a la vegetación. Posteriormente, las larvas de algunos días de edad emigran al océano y retornan aproximadamente 4-6 meses después como ejemplares cristalinos. Una vez adentrado en los cuerpos de agua dulce los cristalinos comienzan a pigmentar y transformarse en adultos. En cambio, las poblaciones de ambientes de agua dulce realizan todo su ciclo de vida en agua dulce (Campos, 1970).

Esta especie se ha explotado comercialmente en Chile, Argentina, Islas Malvinas, Nueva Zelanda, Tasmania y Australia, debido a las similitudes tanto

morfológicas como organolépticas que se observan entre los cristalinos (Fig. 2) y los juveniles de la anguila europea (angulas), el primero se ha presentado en el mercado internacional como un producto sustituto a las angulas (Mardones y col., 1999).



Figura 2. Ejemplares silvestres de puye (*Galaxias maculatus*), en la etapa de cristalino.

La gran demanda del mercado internacional y nacional por el producto, ha generado una rápida disminución de las poblaciones naturales y en la extracción artesanal de este pez en las costas chilenas, quedando en evidencia, que la única alternativa de satisfacer su demanda y bajar la presión por su pesquería, es sentar las bases para el desarrollo de una tecnología de cultivo.

En este contexto, el manejo de la reproducción y el conocimiento de la biología de esta especie, son elementos claves para el desarrollo de su cultivo, ya sea, que se trate de la producción de ovas embrionadas de buena calidad, como insumo básico para la producción de cristalinos de interés comercial, o de la obtención de reproductores con características mejoradas genéticamente. La existencia de manejos sanitarios y conocer los aspectos biológicos de poblaciones de reproductores, es un requisito indispensable.

1.1 TÁCTICAS REPRODUCTIVAS EN *Galaxias maculatus*.

1.1.1 Desove e incubación en el ambiente natural.

Los reproductores de puye (*Galaxias maculatus*), en la naturaleza, tienen una proporción sexual de 1:1, con fecundación externa, teniendo su primera madurez sexual al primer año de vida. Los reproductores, no presentan dimorfismo sexual, sólo es posible diferenciar el sexo en el momento de plena madurez (madurez total), donde la pared abdominal de las hembras se torna transparente y es posible visualizar los ovocitos de aspecto transparente. Después del desove los ovocitos son de tamaño homogéneo (0.8 a 1.2 mm), de poca turgencia y de leve adhesividad. Estas características cambian una vez fecundadas e hidratadas, teniendo como principal característica su alta adhesividad a estructuras o células próximas a ellas. Los machos completamente maduros, son aquellos en que el semen se diluye rápidamente al tomar contacto con el agua (Valdebenito, 1999).

Se ha determinado en nuestro país, que las poblaciones de aguas dulces y estuarinas son eurihalinas, presentando un marcado pico de desoves a fines de invierno-inicio de primavera y otro a finales del verano (Vega, 1999). Este ciclo está regulado, al igual como lo describió Barnabé (1991) en salmones (*Salmo salar*, Salmón coho, Salmón chinook), fundamentalmente por las variaciones de temperatura (7 a 10 °C) y del ciclo fotoperiódico anual (días cortos de 9 horas)

Los reproductores diadrómicos silvestres, para desovar buscan preferentemente entrar en condiciones de marea alta al estuario, donde las salinidades fluctúan entre 10 a 30 ppt (Mitchell, 1991), buscando zonas refugiadas con sustrato preferentemente de piedras o hierbas. Esta zona perteneciente al medio ambiente bentónico, específicamente a la zona supralitoral, se compone típicamente por superficies húmedas y pozas pequeñas en el sustrato, por lo que su condición se hace difícil para ser habitada por plantas y animales, requiriendo

de considerable adaptación a este medio (Lagler y col., 1984), expresando de esta manera, que esta especie no posee capacidad biológica de completar su desarrollo embrionario y por ende reproducirse en el mar, debiendo hacerlo en los cuerpos de aguas completamente dulces (Vega y col., 1998).

Es en esta zona, donde los reproductores aprovechándose de las altas mareas se introducen en el sustrato, depositando sus huevos (que oscilan de 800 a 1200 dependiendo del tamaño de la hembra), produciéndose la fecundación y posterior desarrollo embrionario. Los continuos movimientos de las aguas por efecto de las mareas, mantienen los embriones húmedos protegiéndose de depredadores y condiciones ambientales adversas, facilitando que se incuben por aproximadamente entre 3 a 4 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales. Una vez que eclosionan, migran al mar para retornar al estuario a los 4 a 6 meses de edad, continuando su ciclo (Campos, 1970; Vega, 1999). El puye es una especie iterópara, al igual que los salmones europeos (*Salmo trutta fario*, *Salmo salar*) y su ciclo no ocurre como en la totalidad de los salmones del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), que sólo ciclan una vez, siendo por lo tanto la pubertad y la recrudescencia gonadal un evento único y coincidente (Barnabé, 1991).

1.1.2 Desove en condiciones artificiales.

En condiciones de cultivo experimental, se determinó que el puye es una especie iterópara, que desova en forma parcial durante un periodo de entre 10 a 60 días y con 4 a 11 pulsos de desoves por temporada, con una media de 5 (Valdebenito, 1999). El pico de desoves, es prácticamente igual como ocurre en la naturaleza con los reproductores silvestres, si se tiene cuidado en manejar correctamente factores como la temperatura (entre 7-10 °C), densidades de manejo, calidad de agua (saturación de oxígeno, ausencia de contaminantes), fotoperiodo (días cortos de 8 a 9 horas), la cantidad y calidad de los alimentos distribuidos; factores que van a influir sobre la calidad de los gametos (Barnabé, 1991). Los reproductores, pueden ser acondicionados en dos tipos de estanques:

fibra (régimen intensivo) o tierra (régimen semi-intensivo), alimentados con pellet de salmón, dos veces al día a ración de un 3 % peso corporal, en régimen intensivo, o también, esta misma ración de alimento más una complementaria natural, como copépodos y daphnias, en condiciones semi-intensivas. Además, a los reproductores se les realiza muestreos semanales o quincenales, hasta que alcancen su madurez sexual (Bariles, comunicación personal).

Una vez que los reproductores alcanzan su madurez sexual con las características ya descritas (en el punto 1.1.1), los gametos se obtienen mediante masaje abdominal, previa sedación de los ejemplares con BZ-20 (Benzocaina) a concentración de 1 ppt (Vega y col., 1998). Para realizar la fecundación se utiliza el método húmedo, obteniendo primeramente las ovas y el semen por separado en placas petri de un “pool” de ejemplares, luego se mezclan simultáneamente los gametos en un contenedor de ovas con agua, dejándolas hidratar por 5 minutos. Posteriormente, se limpia el contenedor con agua, para eliminar residuos de semen y se incuba a aproximadamente 10 °C por 30 días, hasta la eclosión.

1.1.3 Incubación artificial.

Los primeros bioensayos efectuados con ovas de *Galaxias maculatus*, apuntaron a utilizar los sistemas tradicionales de incubación, específicamente los usados en ovas de Ciprínidos (vasijas tipo Zoug) y de Salmonídeos (bateas californianas), hasta llegar a una incubación en humedad. Estos sistemas se caracterizan por:

1.1.3.a) *Vasijas tipo Zoug*: Sistema de incubación utilizado para peces de huevos adherentes. Se constituye de vasijas en forma de conos, de fibra de vidrio de color gris y dos litros de volumen útil. Las ovas se mantienen en el interior de un canastillo cilíndrico construido de una lámina de aluminio provista de orificios de 1 mm de diámetro, el cual mantiene en su interior los huevos y evita la salida de las ovas por el tubo de rebalse. En el extremo superior, presenta una tapa que impide

el paso de la luz. El flujo es ascendente, con tasa de cambio 8 veces/hr y el agua es descargada por un tubo de rebalse a 4 cm del borde superior (Vega y col., 1995).

1.1.3.b) *Bateas californianas*: Este es un sistema ampliamente utilizado para distintas especies salmonídeas y presenta características que facilitan el manejo de ovas, además, permite a las larvas cristalinas recibir su primera alimentación. Corresponden a mesas horizontales de fibra de vidrio u otro material resistente, cuyas medidas más comunes son de 83 cm de largo por 42 cm de ancho y 16.5 cm de profundidad. El fondo y frente posterior-superior del canastillo, está constituido por una rejilla de aluminio con orificios de 1 mm de diámetro. En el lado posterior externo, el canastillo tiene una lámina que alcanza hasta el fondo de la mesa para asegurar una circulación tipo “Flow-up” que permita la renovación de agua. El sistema se protege de la luz y se incuba con tasa de cambio 8 veces/hr (Vega y col., 1995).

De estos dos sistemas descritos, el más beneficioso para la supervivencia embrionaria del puye fue el sistema californiano, sistema que sin embargo mostró resultados dispares (Bariles, 1999). Las mortalidades se atribuyeron principalmente a hongos y bacterias, y en menor grado, al sistema físico de incubación.

1.1.3.c) Incubación en humedad: Posteriormente, desarrollando diversos experimentos, imitando lo que ocurre en la naturaleza cuando se incuban las ovas de puye, se observó que grupos de huevos separados para diferentes ensayos y colocados en placas petri con escasa, o ausencia de agua, al cabo de ciertos días continuaban su desarrollo normal sin aparente mortalidad, logrando altas sobrevivencias (alrededor de 83 %) en la eclosión, en comparación a los métodos anteriormente descritos. Estas observaciones, condujeron a investigar la potencialidad de incubar las ovas de puye mantenidas sólo en ambiente húmedo (Bariles, 1999), efectuando numerosas pruebas que permitieron diseñar el sistema

o tecnología de incubación existente, caracterizándose por lo siguiente: Consisten en contenedores de ovas, diseñadas de marcos de PVC de forma cuadrada, con esquinas redondeadas de 30 por 30 cm. La superficie que encierra el marco esta cubierta de una malla de abertura de 600 micrones, con un diseño que permite montar un contenedor sobre otro (Fig. 3), optimizando espacios en la sala de incubación (120 contenedores/m²). Esta sala, es un laboratorio de 5 m² que utiliza un sistema de refrigeración para mantener la temperatura entre 9-10 °C.



Figura 3. Contenedores de ovas de puye (*Galaxias maculatus*), utilizados para el proceso de incubación en humedad.

Este sistema de incubación, permite un fácil manejo, ya que sólo se necesita mantener las ovas húmedas, aspersándolas regularmente (3 a 5 veces al día) con agua con sal a 10 ppt y temperatura promedio de 10 °C. Las ovas al aspersarlas o rociarlas, deben quedar completamente húmedas, evitando que se sequen. Esta salinidad y temperatura combinadas, arrojan los mejores resultados de sobrevivencia al “estado de ojos” ($77.0 \pm 13.9 \%$), eclosión ($67.4 \pm 17.2 \%$) y larval ($81.6 \pm 16.2 \%$), a diferencia de otras salinidades y temperaturas probadas (0, 30 ppt y 15 °C) (Vega y col., 1998). Este sistema, no elimina completamente la presencia de hongos, que se observa más significativamente en el estado de “ova con ojos” (Bariles, 1999).

El sistema húmedo, tiene la ventaja en comparación a los sistema de incubación sumergida, de obtener mayor sobrevivencia embrionaria, mejora la automatización del proceso de cosecha, permite el control de parámetros como temperatura y humedad, optimiza la manipulación sobre el desarrollo del proceso, e impide la propagación de las bacterias, que utilizan como vehículo el agua, disminuyendo la contaminación horizontal entre las ovas.

1.2 DESARROLLO EMBRIONARIO.

El desarrollo embrionario en *Galaxias maculatus*, se puede expresar tomando como referencia los estados de desarrollo en trucha arco iris, descritos por Estay y col. (1994) y de *Galaxias maculatus*, descritos por Benzie (1968) (Tabla 1).

TABLA 1. Etapas en el desarrollo embrionario de *Galaxias maculatus* en unidades térmicas acumuladas (UTA).

ETAPA	Desarrollo en tiempo a 10 ° C y en UTA.	Desarrollo y Manejo Asociado.
1 (Fecundación)	-15 min a -10 min	Obtención de gametos.
2	0 hrs	Fecundación
3 (Segmentación)	10 min a 2 hrs	Hidratación de la ova; Inicio del desarrollo del blastodisco
4	Hasta las 48 hrs (20 UTA)	Blastoporo se cierra; determinación del % de fecundación.
5 (Gastrulación)	7 a 9 días (70 a 90 UTA)	Embrión más definido; cabeza más visible; determinación del % de ovas embrionadas.
6 (Organogénesis)	14 a 15 días (140 a 150 UTA)	Inicio de la pigmentación de los ojos y utilización del vitelo. Planificación del “shocking”.
7	17 a 18 días (170 a 180 UTA)	Ojos bien pigmentados. “Shocking”; Estimación de sobrevivencia embrionaria.
8 (Eclosión)	30 días (300 UTA)	Alevín con saco vitelino (En puye es pequeño y dura 5 días aprox.)

1.3 ENFERMEDADES EN EL PUYE (*Galaxias maculatus*).

La sanidad en acuicultura y en especial en piscicultura, representa un papel importante, por la necesidad que existe en conocer los procedimientos para prevenir y controlar las enfermedades, impidiendo que agentes patógenos ataquen a huevos, larvas y peces sanos (Lázaro-Chávez, 1985 y Kinkelin y col., 1985).

El posible desarrollo de la tecnología masiva de producción del puye, en sus diferentes unidades de producción, dependen de diversos factores para alcanzar su máximo potencial productivo, entre estos factores se encuentran el adecuado manejo sanitario, entendido como la prevención de las principales enfermedades que pueden atacar y afectar el desarrollo de cada etapa del proceso productivo.

1.3.1 Enfermedades en reproductores.

Anteriormente, el puye pertenecía al orden de los salmoniformes, por lo tanto, se esperaba que las enfermedades que afectan a los salmones, sean similares a las que afectan a esta especie, siendo los puyes principalmente propensos a diversas enfermedades, principalmente, por la ausencia de escamas, que lo hace mas susceptible de ser afectado por agentes patógenos oportunistas (Valdebenito, comunicación personal).

Los reproductores son afectados por bacterias (*Flavobacterium spp*), la rickettsia de agua dulce, ectoparásitos (protozoos: *Ichthiophthirius*, *Trichodina sp*, *Chilodonella sp*, *Ichtiobodo necator* o *Costia sp*), tremátodos (*Dactylogyrus sp* y *Gyrodactylus sp*) y endoparásitos (Tremátodos, *Acanthocephalus*) (Vega, 1999). Pero estas enfermedades son causadas por diversos factores importantes en el cultivo, que al no ser correctamente manejados en condiciones de cautiverio, pueden gatillar en el brote de la enfermedad.

1.3.1.1 Factores que inciden en las enfermedades de reproductores.

1.3.1.1.a) *Temperatura*: La temperatura es uno de los factores más importante, ya que es causa directa del brote de la enfermedad (Barnabé, 1991). Para los reproductores, su rango de temperatura óptima fluctúa entre 7 y 10 °C (7 °C el óptimo), permitiendo que se mantengan estables y el desarrollo gonadal sea el adecuado (Vega, 1999). Elevadas temperaturas tienen como resultados alteraciones en el metabolismo de los peces, les aumenta el estrés, no se alimentan, y con ello se vuelvan más susceptibles de ser atacados por enfermedades que puedan ocasionar gran deterioro en su desarrollo, también la muerte (Barnabé, 1991).

1.3.1.1.b) *Estrés*: Cuando se tiene “stocks” de reproductores silvestres en cautiverio, en una situación distinta a su ambiente natural, donde las enfermedades, si están, se encuentran en equilibrio. Los ejemplares se deben acostumbrar a su nueva condición de encierro, al tipo de alimento, a la manipulación, y por lo tanto, se vuelve más factible que afloren las enfermedades (Barnabé, 1996 y Reichenbach-Klinke, 1982).

1.3.1.1.c) *Calidad de agua*: Es un factor fundamental para dar las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo a los ejemplares (Reichenbach-Klinke, 1982). En puyes, la tolerancia de oxígeno va desde 5-12 mg/L (óptima 9 mg/L), asegurando la estabilidad de sus procesos biológicos (González, comunicación personal). En el caso de la salinidad para los reproductores, no tienen inconvenientes de ser mantenidos en agua dulce, comprobando que en esta condición no presentan problemas de desarrollo hasta la madurez (Vega, 1999). También es importante mantener controlados los niveles de residuos nitrogenados, como el amoníaco que es muy tóxico en su forma ionizada y es el causante de interrupciones de crecimiento; los nitritos por su parte, provocan anomalías sanguíneas (metahemoglobinemia) (Barnabé, 1991). También es

importante controlar los niveles de fósforo en el agua, causado por el exceso de sedimento, producto de la sobrealimentación y las heces.

1.3.1.1.d) *Alimentación*: Es el elemento más importante dentro del cultivo, ya que entrega a los peces todos los nutrientes y la energía necesaria para desarrollar todos sus procesos biológicos (Barnabé, 1991; 1996). En cuanto a los alimentos artificiales hay que asegurar que tengan los componentes necesarios como Proteínas (45-55 %), lípidos (7-8 %), carbohidratos (10-14 %) y vitaminas entre otros componentes, que contribuyan al desarrollo óptimo de reproductores (Barnabé, 1991). En el caso de alimentación natural, la cantidad y calidad del alimento a suministrar, como Rotíferos, Copépodos y Daphnias deben ser fundamentales para lograr tener incidencia en los individuos en el crecimiento y desarrollo en todas sus fases (Bórquez y col., 1999).

1.3.1.2 Medidas preventivas para enfermedades en reproductores.

En el puye, dentro de las medidas preventivas, cuando se tienen poblaciones para generar producciones de ovas de buena calidad y posteriores cristalinos, controlando la presencia y desarrollo de enfermedades, se pueden encontrar y aplicar las siguientes medidas: La realización y posterior desarrollo de un plan de cuarentena, individualización de los estanques (material para cada estanque, flujo de agua, etc), definición de medidas terapéuticas de tratamiento para cada enfermedad si se presenta, extracción de la mortalidad una vez al día, controlar temperatura, alimento, pH, calidad de agua y disminuir el estrés (Mendoza y col, 1999).

Las pisciculturas, que no aplican ciertas medidas sanitarias preventivas básicas, correrán el riesgo de sufrir mortalidades inesperadas en sus producciones, de manera que, se deben tomar las medidas profilácticas adecuadas cuando se produzca un signo de enfermedad o cuando, por ciertos factores bióticos o abióticos se detecta la presencia de agentes patógenos

(Aguayo, 1995). Todos estos factores preventivos y que intervienen directamente en la obtención de reproductores de buena calidad, son fundamentales para obtener “stocks” de ovas de gran potencial para desarrollar producciones de cristalinos a posteriori.

1.3.2 Enfermedades en ovas

En el caso específico de la fase de incubación de ovas, uno de los mayores problemas es el ataque producido por hongos que actúan a través del agua, y que también se presentan, cuando el manejo de las condiciones sanitarias no son las correctas. En el caso de *Galaxias maculatus*, no existen estudios relacionados con este tema, pero en referencia a las características de sus huevos y su incubación, es distinta a lo que se realiza en general en salmones (del género *Oncorhynchus spp* y *Salmo salar*), ya que en estos últimos, sus huevos son grandes y no adhesivos, lo que permite una incubación en bateas con agua constante. Esto tiene la ventaja de realizar manipulaciones de instalación con las ovas hidratadas, que son más resistentes (Estay y col., 1994). Además, mediante la extracción manual de huevos muertos (picaje), se puede mantener bajo control la proliferación de hongos durante la incubación, cuyo principal sustrato son las ovas muertas. En cambio, los huevos de puye, tienen la característica de ser más pequeños y adhesivos, y se incuban en humedad (Bariles, 1999). Al tener estas características, principalmente su alta adhesividad, dificulta su manejo (como el picaje) durante la incubación artificial.

La capa mucosa que envuelve los huevos de puye y que les confiere la adhesividad, aparte de aglutinar los huevos en racimos, asfixiando a los que quedan al interior de éstos, atrapan las partículas de material orgánico, lo que trae consigo la rápida colonización de microorganismos y zoosporas de hongos (Velásquez, 1994), provocando que las ovas muertas infecten a las ovas sanas, al entrar en contacto con ellas, conllevando a un aumento de la mortalidad durante esta fase de cultivo.

Existen diversos agentes, como bacterias y protozoos que proliferan entre los huevos desde el exterior destruyendo su cubierta y provocando su muerte, siendo el hongo *Saprolegnia sp* el patógeno mas frecuente en atacar los huevos de peces, del grupo de los salmoniformes y ciprínidos, en especial a los del puye mientras se incuban.

1.3.2.a) *Saprolegnia sp.*

La infección provocada por la *Saprolegnia* es llamada saprolegniasis (Roberts, 1989 y Beakes y col., 1994), y es causada por hongos pertenecientes a varios géneros, como *Saprolegnia*, *Achlya*, *Dictyuchus*, *Aphanomyces*, *Leptomitus* y *Phytium*, de los cuales *Saprolegnia* (*Saprolegnia parasítica*, *Saprolegnia monoica*, *Saprolegnia mixta*, *Saprolegnia feray*, *Saprolegnia thureti*) y *Achlya* (*Achlya poliandra*, *Achlya polífera*) son las mas frecuentes (Pérez, 1982).

La saprolegniasis en general, se puede encontrar en todo ecosistema acuático y ataca significativamente a pescados y a huevos, principalmente cuando ocurren ciertos cambios en el ambiente que se cultivan, que hacen que aparezca el hongo (Bruno y col., 1994).

Además, tiene un ciclo de vida complejo, que incluye reproducción sexual y asexual. Siendo considerado generalmente un patógeno secundario (Whisler, 1996), también puede actuar como primario, atacando a través de sus esporas los tejidos epidérmicos, comenzando generalmente por la cabeza y las aletas (Neish, 1977 y Willoughby, 1994), extendiéndose por toda la superficie del cuerpo, causando necrosis celular con daño cutáneo y epidérmico. Cuando atacan a ovas de peces en incubación, cuando se presentan mortalidades por ovas débiles o no fecundadas, el hongo penetra la membrana afectando la ova, y se produce la proliferación a través del agua a otras mas cercanas, causando la muerte. En ovas de *Galaxias maculatus*, la saprolegniasis se diagnostica cuando está más desarrollada, manifestándose principalmente, cuando están en la etapa de “ova

con ojos”, formándose un revestimiento de filamentos fungosos (pelusa algodonosa) llamadas hifas (Fig. 4), que se ubican sobre los huevos muertos, y trasladándose rápidamente a los huevos sanos más próximos (Quezada, 1997), producto de la características de las ovas, de ser principalmente más adhesivas.



Figura 4. Ovas muertas de puye (*Galaxias maculatus*), cubiertas de filamentos fungosos (hifas).

1.4 TRATAMIENTOS PROFILÁCTICOS EN OVAS.

Toda causa de mortalidad, se puede evitar utilizando medidas profilácticas adecuadas en los huevos, así como manteniendo desinfectados los sistemas de incubación y materiales usados para el proceso. Las infecciones fúngicas, son difíciles de prevenir y de tratar, por lo tanto, el uso apropiado de productos químicos y no químicos pueden ser necesarios cuando se diagnostica a tiempo el agente patógeno. Para el caso de la industria salmonera y otros peces (Ciprínidos), existen en el mercado una amplia variedad de antifúngicos que permiten prevenir y combatir el efecto dañino de estos microorganismos, sin embargo, hay pocos productos químicos aprobados para el uso en acuicultura en Estados Unidos y otras regiones por la administración de alimentos y drogas

(FDA) (Meyer, 1991 y Fitzpatrick y col., 1995). Dentro de los químicos más usados en los últimos años se pueden señalar:

1.4.1 *Verde de Malaquita*: Es considerado el más efectivo químico para controlar la saprolegniasis (Willoughby y col., 1992 y Bruno y col., 1994), incluso al compararlo con otros tipos de químicos (Cline y col., 1972). Pero es considerado un potencial agente cancerígeno en las personas (Fitzpatrick y col., 1995), como también se ha comprobado, afecta a salmones al influir en el decrecimiento de los niveles de leucocitos en la sangre (Glavolena y col., 1968), por lo cual, ha sido prohibida su utilización en muchos países entre los que se encuentra Chile, abriendo la necesidad de buscar otros antifúngicos, que reemplacen al verde de malaquita, en controlar los agentes patógenos.

1.4.2 *Formalina*: Es uno de los pocos fungicidas acuáticos registrados para ser utilizado en acuicultura, y su uso como reemplazante del verde de malaquita ha ido incrementándose. Utilizando soluciones concentradas de 37 % de formaldehído (Van Waters, 1988), aplicada a diferentes dosis, es efectivo en tratar la saprolegniasis, además, es uno de los primeros fungicidas registrados para usarse en acuicultura en U.S.A. (Marking y col., 1994). Se han realizado varias experiencias utilizando este químico, principalmente en ovas de salmón, catfish y carpa. Se ha evaluado la eficacia de la formalina como profiláctico en distintas dosis (250, 400, 500 ppm por 30 y 60 minutos), por si sola en trucha arco iris (Marking y col., 1994), y también comparándola con otros químicos (sal, yodo, peróxido de hidrogeno) en huevos de catfish (Walser y col., 1993), salmón chinook (Waterstrat y col., 1995), *Cyprinus carpio* (Froelich y col., 1996) y trucha arco iris (Schreier y col., 1996). Utilizando sistemas de incubación en condiciones de criadero ("hatchery") (sistema vertical, californiano, Zoug, etc), aplicándolas deteniendo el flujo, con baños estáticos a intervalos de tiempo (cada dos días), hasta la eclosión; obteniendo la formalina a 250 y 400 ppm por 60 minutos, los mejores resultados en comparación a otros químicos, en los porcentajes de

eclosión, y que en todas ellas, la formalina es efectiva en prevenir y atacar la proliferación de hongos y bacterias, en ovas de distintas especies.

También se ha comparado la formalina con el picaje en salmón chinook (Barnes y col., 1997), utilizando sólo formalina (1667 mg/L por 15 min), formalina con picaje y sólo picaje. Se utilizó un sistema de incubación vertical donde se sumergían las ovas en el tratamiento por 15 días hasta la eclosión. Concluyendo, que el uso de formalina ayuda a mejorar la sobrevivencia (30 %, por sobre el control), disminuyendo el ataque bacteriano, como también que el picaje no es tan efectivo en remover totalmente la presencia de las esporas de *Saprolegnia sp.*

1.4.3 *Sal (sal de mar)*: Estudios conducen a que en ovas de salmónidos (*Oncorhynchus spp*) y catfish (*Ictalurus punctatus*), indican que la sal es un tratamiento efectivo para eliminar la infestación de hongos (Taylor y col., 1979 y Edgell y col., 1993), como también es un elemento de bajo costo y de fácil disponibilidad. Existe además, desventajas en el uso de la sal, siendo en que grandes cantidades requeridas en algunos casos limitan su aplicabilidad (Marking y col., 1994). Se han realizado diversos estudios en condiciones de hatchery tanto en trucha arco iris (Marking y col., 1994; Schreier y col., 1996 y Kitancharoen y col., 1998), salmón chinook (Waterstrat y col., 1995) y catfish (Phelps y col., 1993 y Froelich y col., 1996). Utilizando distintas dosis (5, 25, 30 ppt y 1000 ppm) con flujos cerrados en sistemas artificiales, dependiendo de cada especie en condiciones de hatchery. Se concluyó que la sal es un elemento efectivo para prevenir y eliminar la presencia de hongos, favoreciendo el aumento de los porcentajes de eclosión. El cloruro de sodio en altas concentraciones (25 y 30 ppt por 60 minutos) es letal para la saprolegniasis y efectiva para controlar la *Saprolegnia parasítica* (Willoughby, 1994), siendo un candidato apto para reemplazar el verde de malaquita. Además, la sal es muy poco tóxica y reduce el riesgo ambiental por ser poco dañino para los peces y personas (Froelich y col., 1996).

1.4.4 *Yodo*: En la industria salmonera en Chile, uno de los químicos más utilizados para realizar la profilaxis es el yodo, debido a que es un desinfectante yodóforo especialmente formulado para la desinfección de huevos (Quezada, 1997). Sus soluciones tienen un pH neutro, a fin de no causar daño a los huevos durante la desinfección. Se componen de un complejo tensoactivo no iónico yodo/yoduro con 1,5 % de yodo activo. Este producto además, cubre un amplio espectro de acción contra organismos como bacterias, hongos y virus (Vega, 1999). Dentro de las aplicaciones del yodo, en salmones (*Salmo salar*, salmón coho y trucha arco iris) la concentración usada es de 100 ppm por 60 minutos en condiciones de hatchery, aplicándose a intervalos de días, en bateas horizontales con flujo cerrado, hasta antes de la eclosión.

En otras especies se ha evaluado y comparado el yodo, tales como el Catfish (Walser y col., 1993) y *Galaxias maculatus* (Quezada, 1997), estimando para el primero a 200 ppm por 30 minutos, incrementa los porcentajes de eclosión y controla de manera efectiva la saprolegniasis. En *Galaxias maculatus*, se han hecho varios ensayos para evaluar el yodo, a una concentración de 100 ppm, el cual no ha tenido buenos resultados por las características de las ovas de puye y el periodo de aplicación del tratamiento (Quezada, 1997 y Vega, 1999).

1.4.5 *Peróxido de hidrogeno*: Es un promisorio químico para el tratamiento de *Saprolegnia sp.* (Marking y col., 1994; Fitzpatrick y col., 1995), con un mínimo impacto medioambiental (Bruno y col., 1994; Mitchell y col., 1997) . Este elemento fue aceptado por la FDA en 1994 como un profiláctico efectivo para ser utilizada en ovas de peces. Se han realizado varias investigaciones para evaluar el peróxido de hidrogeno en especies salmonídeas, como en trucha arco iris (Marking y col., 1994; Schreier y col., 1996; Kitancharoen y col., 1998) y salmón chinook (Waterstrat y col., 1995), aplicando los tratamientos, de la misma manera como se hace con la formalina, encontrando que a 500 y 1000 ppm es efectiva para controlar los agentes patógenos y mejorar los porcentajes de eclosión. Además, a 1000 ppm el peróxido de hidrogeno es letal para los hongos, matando

la germinación de zoosporas y no permite el crecimiento de las hifas (Barnes y col., 1998). También el peróxido de hidrogeno puede ser usado efectivamente en lugar del verde de malaquita, ya que su acción es similar a este elemento, incluso mejor a la aplicación de cloruro de sodio como tratamiento profiláctico (Kitancharoen y col., 1998).

1.4.6 *Otros Químicos*: Existe una gran variedad de químicos existentes que pueden ser utilizado para eliminar la presencia de hongos (*Saprolegnia sp*). Se han evaluado más de 25 químicos potencialmente aptos para actuar como profilácticos (Cline y col., 1972; Marking y col., 1994; Hussein y col., 2000 y Hussein y col., 2002), determinando que son efectivos en controlar la infección de hongos. Estos son: el A-73336, Amorolfina, Glutaraldehydo, Thymoquinona, Eugenol y Melaleuca. Pero estos, no son tan seguros en comparación a los anteriormente descritos, en prevenir y eliminar la presencia de agentes patógenos, como la *Saprolegnia sp*. En el caso del Eugenol y la Thymoquinona controlan la saprolegniasis, pero son altamente tóxicas para salmones y en menor grado para los ciprínidos (Hussein y col., 2000 y Hussein y col., 2002), y también de afectar en cierta medida al medioambiente.

Existe un nuevo producto elaborado por Novartis (2001), llamado Pyceze, el cual es efectivo para tratar la saprolegniasis. Este nuevo producto ha sido aprobado por Gran Bretaña y actualmente es utilizado en los cultivos en Noruega, Suecia, Finlandia e Islas Faroe. También podría ser utilizado en América, incluyendo Chile. Pyceze es un líquido que contiene 50 % p/v de bronopol BP (2-bromo-nitropropano 1,3 diol). El químico, tiene un perfil seguro y la dosis estándar a suministrar es 1 ml de Pyceze por 10 litros de agua de incubación (equivalente a 50 mg bronopol/L) durante 30 minutos. El método de aplicación va a depender de las condiciones de cultivo y el sistema de incubación del hatchery, teniendo cuidado en que el personal ocupe guantes y mascarilla para prevenir la inhalación u otros inconvenientes.

Dado que *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) es una especie que recién se está estudiando, con el fin de lograr con ella cultivos controlados, la pregunta que conviene hacerse es ¿Qué tipos de tratamientos profilácticos serían más eficientes de utilizar, para mejorar los porcentajes de sobrevivencia embrionaria hasta eclosión?

El presente trabajo correspondiente a una Tesis de Grado, que pretende evaluar diferentes tratamientos profilácticos, con el fin de determinar si logran mejorar la sobrevivencia embrionaria a eclosión y además si su utilización es factible en ovas de *Galaxias maculatus*.

II. OBJETIVO GENERAL.

- ◆ Evaluar diferentes tratamientos profilácticos usados en peces por la industria acuícola, que mejoren la sobrevivencia embrionaria a eclosión y cuya utilización sea técnicamente viable en ovas de *Galaxias maculatus*.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- ◆ Determinar la sobrevivencia, de ovas tratadas con formalina a una concentración de 250 ppm, como baño profiláctico.
- ◆ Determinar la sobrevivencia, de ovas tratadas con sal (sal de mar) a una concentración de 30 ppt, como baño profiláctico.
- ◆ Determinar la sobrevivencia, de ovas tratadas con yodo a una concentración de 100 ppm, como baño profiláctico.

2.2 PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.

H0: Los tratamientos profilácticos de sal, formalina y yodo no mejoran la sobrevivencia embrionaria en ovas de *Galaxias maculatus*.

H1: Los tratamientos profilácticos de sal, formalina y yodo si mejoran la sobrevivencia embrionaria en ovas de *Galaxias maculatus*.

III. MATERIALES Y METODOS.

En la aplicación de los tratamientos profilácticos, el experimento fue repetido tres veces, en el mismo lapso de tiempo, desde el 26 de octubre hasta el 24 de noviembre del 2001.

3.1 ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES.

Los reproductores utilizados en los tres bioensayos, fueron de segunda generación nacida en cautiverio (F2), en el “hatchery” de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco. Luego de su primer año de vida, fueron trasladados y acondicionados en la piscicultura del proyecto Fondef D99I1003 en Faja Maisan, en estanques de tierra de 200 metros cúbicos, con flujo abierto, en condiciones de crianza semi-intensiva, alimentados sobre la base de zooplancton producido en el mismo estanque y reforzada con pellet para salmones a una frecuencia de tres veces al día a saciedad. Los reproductores se muestrearon cada 15 días, seleccionando aquellos ejemplares con desarrollo gonadal completo (madurez total) visualmente sanos y libres de enfermedades (Fig. 5).



Figura 5. Hembra de puye (*Galaxias maculatus*), con madurez total.

Los reproductores seleccionados con estas características fueron 8 hembras con pesos entre 5-8 g y 4 machos con pesos entre 4-6 g, efectuando el desove inmediatamente.

3.2 DESOVE DE REPRODUCTORES.

Este consistió, en obtener los gametos mediante masaje abdominal, sedando los reproductores con el anestésico Benzocaína (BZ-20) a concentración de 1 ppt. Primero, se obtuvo el semen de los 4 machos en una placa petri formando un “pool”. Luego, se guardó en un lugar refrigerado, a temperatura de 9 °C, a la espera de las ovas para la fecundación. A cada hembra, se aplicó el mismo procedimiento, depositando los huevos en una placa manteniéndolas cubiertas, refrigeradas a 9 °C y evitando pérdida de humedad.

Inmediatamente, utilizando el método húmedo, en forma manual y agregando agua dulce, se mezclaron simultáneamente los gametos en un contenedor de ovas sumergido levemente en agua dulce, esparciendo los huevos y dejándolos reposar por 5 minutos para que se hidraten. Luego, el contenedor fue limpiado cuidadosamente con agua dulce, extrayendo residuos de semen que puedan producir infección y se aspersó con agua dulce para que las ovas permanezcan húmedas. Finalmente, el contenedor de ovas fue introducida en una caja de plumavit, con “pack” de hielo a temperatura de 10 °C, y trasladada a la sala de incubación de la Escuela de Acuicultura en la Universidad Católica de Temuco, para iniciar su proceso de incubación.

Después de 24 horas de la fecundación, se determinó el porcentaje de fertilización tomando al azar un lote de 50 ovas en una placa petri, con tres réplicas, observando la presencia del estado de mórula.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.3.1 Químicos utilizados:

Formalina: Con una composición de 37 % de Formaldehído. Elaborado por Veterquímica Ltda. Santiago. Chile.

Yodo: El utilizado fue aqua-yodo y se compone de un complejo tensoactivo no iónico yodo/yoduro con 1.5 % de yodo activo, a pH neutro. Elaborado por Veterquímica Ltda. Santiago. Chile.

Sal: Se utilizó sal de mar, con la marca Súper Sal Lobos S.A. Granulada Preservante 0.80 N, con una composición química de Cloruro de Sodio (99.150% min.), Sulfatos (0.500% máx.), Calcio (0.090% máx.), Magnesio (0.030% máx.) e Insolubles (0.070% máx.)

3.3.2 Procedimiento de tratamiento.

3.3.2.a Incubación.

El proceso de incubación, fue de la misma manera como se realiza utilizando los contenedores de ovas, efectuándose de la siguiente forma: Para los tratamientos, se utilizaron 2000 ovas de *Galaxias maculatus* de 24 horas de desarrollo, distribuidas al azar en placas petri (100 en cada placa). Cada tratamiento, tenía 5 replicas y fue aplicado a la unidad experimental que son las “ovas con ojo” y la respuesta a analizar fue mejorar la sobrevivencia embrionaria en la eclosión (Tabla 2).

Todas las placas se incubaron en humedad, rociándolas 3 veces al día con agua con sal a 10 ppt, quedando completamente húmedas, metodología que resulta más eficiente desde el punto de vista de la sobrevivencia embrionaria y larval (Bariles, 1999). La temperatura promedio de incubación fue de $9,69 \pm 0.83$ °C, llevando un registro diario de ellas.

Tabla 2. Diseño experimental de los tratamientos (N° ovas), con sus dosis y replicas

CONTROL	FORMALINA	YODO	SAL
	250 ppm por 1 hr.	100 ppm por 1 hr.	30 ppt por 1 hr.
100	100	100	100
100	100	100	100
100	100	100	100
100	100	100	100
100	100	100	100

Una vez que las ovas alcanzaron el estado de "ova con ojos", específicamente con los ojos pigmentados (Fig. 6) el 9 de noviembre del 2001 (14 días de incubación y 135.8 UTA), se comenzaron a aplicar los tres tratamientos profilácticos. Esto se hizo cada dos días, en total 7 veces, hasta el 23 de noviembre (28 días de incubación y 271.6 UTA), debido a que los embriones estaban muy activos (acto-reflejo a la luz y al rociarlas con agua), por el cual, se determinó detener los tratamientos, cubrir de agua las placas y esperar la eclosión.

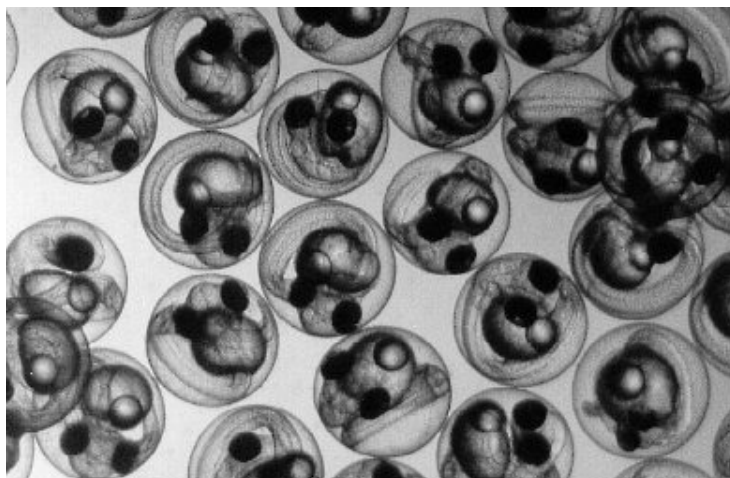


Figura 6. Ovas embrionadas de puye (*Galaxias maculatus*), con ojos pigmentados después de 250 UTA de incubación.

3.3.4.b Tratamientos.

Control: Las 5 réplicas, se incubaron en humedad a 10 ppt durante todo el proceso, cambiando el agua con sal tres veces al día, sin recibir tratamiento profiláctico.

Formalina (250 ppm): Las 5 réplicas, se incubaron en humedad a 10 ppt, cambiando el agua con sal tres veces al día, hasta alcanzar el estado de “ova con ojos”(con los ojos pigmentados). Luego, cada placa se limpió con agua dulce, extrayendo el agua con sal, hasta que quedaron secas (sin agua). En seguida, se aspersó la solución de formalina, dejando las ovas en ambiente húmedo (al igual que si fuesen incubadas a 10 ppt) por 60 minutos. Transcurrido el tiempo, cada placa se limpió cuidadosamente con agua dulce, hasta eliminar completamente los residuos del tratamiento. Posteriormente, se volvía a aspersar con agua con sal a 10 ppt, continuando su incubación, hasta aplicar cada dos días nuevamente, el mismo procedimiento.

Yodo (100 ppm): Las 5 réplicas se incubaron en humedad a 10 ppt, hasta la etapa de “ova con ojo”(con los ojos pigmentados). Luego, cada placa sin agua era aspersada con la solución, dejando las ovas en humedad por 60 minutos. Después cada placa se limpiaba cuidadosamente con agua dulce, hasta eliminar completamente los residuos del tratamiento. En seguida, se volvía a aspersar con agua con sal a 10 ppt, continuando su incubación, aplicando cada dos días el tratamiento profiláctico.

Sal (30 ppt): El procedimiento de tratamiento de las 5 replicas, fue similar al efectuado con la formalina y el yodo.

Una vez eclosionadas las larvas, en cada bioensayo, a partir del día 29 (281.3 UTA) hasta el día 32 de incubación (310.4 UTA), se determinó el porcentaje de sobrevivencia, para posteriormente tomar al azar de cada tratamiento 100 larvas, depositándolas en vasos precipitados de 1 litro, con agua a 10 ppt, usando aireación y alimentadas con rotíferos, obteniendo con esto, la sobrevivencia larval en 15 días (Tabla 3), que permite proyectar el efecto o influencia de los tratamientos, durante el desarrollo embrionario en la sobrevivencia de las larvas.

Tabla 3. Diseño para determinar sobrevivencia larval (15 días), indicando el número de larvas por frasco de 1 litro.

BIOENSAYO	CONTROL	FORMALINA	YODO	SAL
N°1	100	100	100	100
N°2	100	100	100	100
N°3	100	100	100	100

3.3.5 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos porcentuales, de la sobrevivencia en la eclosión y larval de 15 días, se adaptaron mediante la transformación arcoseno. Para los resultados de los 3 bioensayos y de la sobrevivencia larval, se aplicó primeramente la homogeneidad de varianzas y la normalidad en los errores, utilizando el test de Bartlett y la estadística del chi-cuadrada. Pasado este paso, se aplicó de acuerdo al diseño experimental (bloques completamente aleatorio) la ANOVA, y con el resultado de esta (H_0 rechazada) se aplicó el test de Tukey, para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos de cada bioensayo. Para la estimación de la sobrevivencia larval a los 15 días se tomaron 20 larvas de cada replica, quedando cada bioensayo con 100 larvas.

IV. RESULTADOS.

La incubación, en los 3 bioensayos, finalizó el 27 de noviembre del 2001, durando en total 32 días (310.4 UTA) y el promedio de temperatura fue de 9.69 ± 0.83 °C.

Los promedios de los porcentajes de sobrevivencia a eclosión, de los tratamientos aplicados en cada bioensayo, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de eclosión (Promedio \pm DE), en ovas de *Galaxias maculatus* en los 3 bioensayos, sometidas a tratamientos profilácticos de formalina, yodo y sal.

BIOENSAYO	REPLICAS	CONTROL	YODO 100 ppm	FORMALINA 250 ppm	SAL 30 ppt
N° 1	5	A 70.80 ± 9.44	A 70.80 ± 3.34	A 77.60 ± 2.60	B 90.40 ± 6.22
N° 2	5	A 66.00 ± 4.69	A 70.00 ± 6.92	A 73.20 ± 5.93	B 97.20 ± 2.68
N° 3	5	A 64.80 ± 9.01	A 68.80 ± 8.67	A 80.00 ± 7.74	B 96.80 ± 3.63

Letras distintas indican las diferencias estadísticamente significativas.

Bioensayo 1: El promedio de eclosión para la sal fue de $90.40 \pm 6.22 \%$, observándose diferencias significativas de sobrevivencia con los demás tratamientos de formalina ($77.60 \pm 2.60 \%$), yodo ($70.80 \pm 3.34 \%$) y control ($70.80 \pm 9.44 \%$) (Fig. 7).

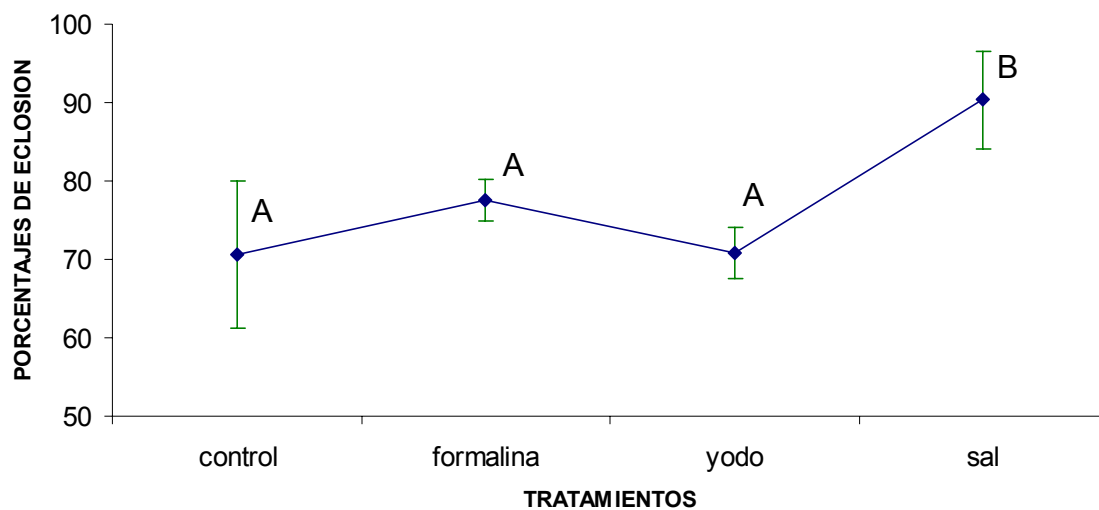


Fig. 7. Porcentajes eclosión (Promedio \pm DE), obtenidos en embriones de puye (*Galaxias maculatus*) sometidos a tratamientos profilácticos de sal, yodo, formalina y control. Letras distintas indican las diferencias estadísticamente significativas.

Bioensayo 2: En este, se obtiene un promedio de eclosión para la sal de $97.20 \pm 2.68 \%$, observándose al igual que el bioensayo 1, diferencias significativas de sobrevivencia con los otros tratamientos de formalina ($73.20 \pm 5.93 \%$), yodo ($70.00 \pm 6.92 \%$) y control ($66.00 \pm 4.69 \%$) (Fig. 8).

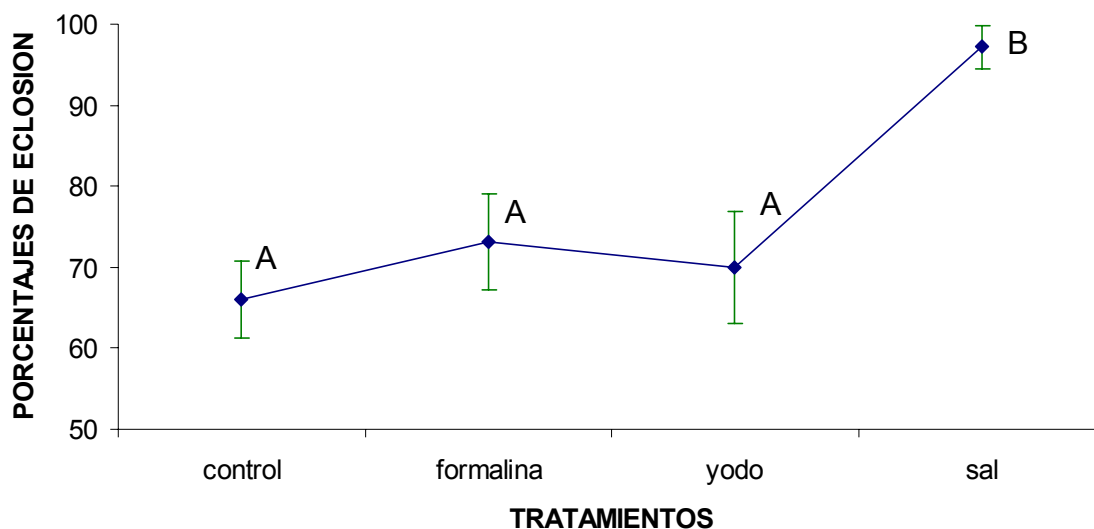


Fig. 8. Porcentajes eclosión (Promedio \pm DE), obtenidos en embriones de puye (*Galaxias maculatus*) sometidos a tratamientos profilácticos de sal, yodo, formalina y control. Letras distintas indican las diferencias estadísticamente significativas.

Bioensayo 3: En este experimento, se mantiene la tendencia de obtener elevados porcentajes de eclosión para el tratamiento con sal (96.80 ± 3.63 %), obteniendo en relación con los demás tratamientos de formalina (80.00 ± 7.74 %), yodo (68.80 ± 8.67 %) y control (64.80 ± 9.01 %) diferencias significativas en la sobrevivencia embrionaria a eclosión (Fig. 9).

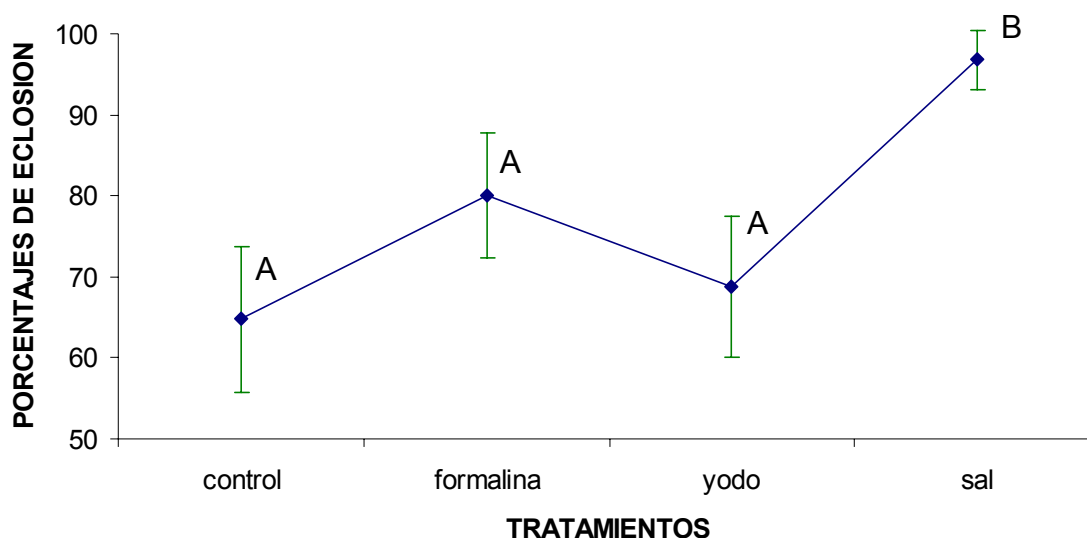


Fig. 9. Porcentajes eclosión (Promedio \pm DE), obtenidos en embriones de puye (*Galaxias maculatus*) sometidos a tratamientos profilácticos de sal, yodo, formalina y control. Letras distintas indican las diferencias estadísticamente significativas.

La obtención de elevados porcentajes de eclosión con el tratamiento de sal, es corroborado por la ANOVA de bloques completamente aleatorios, que determinó (tabla de Fisher con 5% de significación) que la aplicación de tratamientos profilácticos logran mejorar la sobrevivencia embrionaria en relación al control (rechazando H_0). Además de esto, el test a posteriori (Tukey, con un nivel de significancia de 0.05), establece que sólo el tratamiento profiláctico de sal posee diferencias significativas ($p < 0.05$) con los otros tratamientos, por lo cual, la aplicación de sal (30 ppt) como baño profiláctico en ovas de *Galaxias maculatus*, es efectiva en mejorar la sobrevivencia embrionaria a eclosión.

Después de 15 días de producida la eclosión, los resultados de la sobrevivencia de las larvas, provenientes de las ovas tratadas con sal, formalina, yodo y control, son expresados en la Tabla 5.

TABLA 5. Número de larvas sobrevivientes después de 15 días de la eclosión por bioensayo, obtenidas de embriones de puye (*Galaxias maculatus*) sometidas a diferentes tratamientos profilácticos.

BIOENSAYO	CONTROL	FORMALINA	YODO	SAL
N°1	75	68	52	82
N°2	76	70	60	85
N°3	73	74	63	92
PROMEDIO	74.66 ± 1.52	70.66 ± 3.05	58.33 ± 5.68	86.33 ± 5.13

El promedio de sobrevivencia de las larvas provenientes de ovas tratadas con sal fue de 86.33 ± 5.13 %, obteniendo diferencias significativas ($p < 0.05$) con los otras sobrevivencias, señalando con esto, que el tratamiento de sal es inocuo en la sobrevivencia larval.

V. DISCUSIÓN.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cada bioensayo, se determinó que los tratamientos profilácticos, logran mejorar la sobrevivencia embrionaria en ovas de *Galaxias maculatus*, pero más específicamente, el tratamiento de sal fue el que tuvo mejor resultado, reflejado en los porcentajes de sobrevivencia a eclosión (Fig. 7, 8 y 9).

Además, el análisis estadístico determinó que el tratamiento de sal, posee diferencias significativas ($p < 0.05$) con los demás tratamientos, con promedios de eclosión de 90.40 ± 6.22 %, 97.20 ± 2.68 % y 96.80 ± 5.63 %, para cada bioensayo, respectivamente (Tabla 4). De acuerdo con esto, se reflejó una mínima mortalidad de ovas embrionadas, después de aplicar el tratamiento, además no se observó la presencia de hifas de hongos, por acción de la saprolegniasis. Esto, concuerda con Phelps y col. (1993), Marking y col. (1994) y Kitancharoen y col. (1998), que señalaron que la aplicación de sal como tratamiento profiláctico, es efectiva para prevenir y atacar agentes infecciosos, como también, que su utilización puede ser óptima para ovas de diferentes especies de agua dulce de interés comercial (catfish, carpa y trucha arco iris).

Edgell y col. (1993) y Willoughby (1994), describieron que la aplicación de sal a concentraciones altas (20-30 ppt), en salmón chinook, es más efectiva (con relación a otros químicos señalados en esta investigación), para prevenir y atacar agentes fungicidas, principalmente el hongo *Saprolegnia sp.* Además, Taylor y col. (1979) y Froelich y col. (1996) señalan que la incubación de ovas, usando sal como tratamiento, es poco tóxica, con un bajo riesgo ambiental, sin dañar o influir en el crecimiento de los peces, además, que es un compuesto de bajo costo y fácil disponibilidad, agregando finalmente, que este químico puede ser usado para reemplazar efectivamente al verde de malaquita, compuesto utilizado por largos años por la industria salmonera.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas, comparando el tratamiento de sal con el yodo (Fig. 7, 8 y 9), se debió principalmente, a que esta última al momento de aplicarse a ovas de puye, se observó mortalidades que oscilaron en todos los bioensayos en alrededor de 30 %. Esto concuerda, con la aplicación efectuada por Quezada (1997) en *Galaxias maculatus*, que obtuvo alrededor de 66 % de mortalidad, debida principalmente a que el compuesto provocó daño considerable a las ovas, matando los embriones. Esto, a pesar de que tuvo un efecto positivo en prevenir que las hifas del hongo actúen matando a las ovas sanas más cercanas. Estas observaciones, concuerdan con esta investigación, ya que, aunque no se observó hifas del hongo, sí se detectó mortalidades en los embriones. Pero también, las diferencias de sobrevivencia en la eclosión obtenidas en esta investigación (Tabla 4), con la que obtuvo Quezada (1997), se debió a que en ese experimento se utilizaron ovas de 24 horas de desarrollo, y no cuando los embriones tenían los ojos pigmentados, por lo cual, esta metodología de diseño resultó importante al momento de comparar estas investigaciones. Pero, a pesar de las diferencias de diseño experimental con Quezada (1997), los resultados de sobrevivencia, de esta investigación, no concuerdan con los experimentos hechos por Walser y Phelps (1993) que concluyeron que el yodo, es efectivo en obtener elevados niveles de eclosión (alrededor de 28 %, por sobre el control) y de no dañar los embriones al aplicarla en ovas de *Ictalurus punctatus*, aunque si señalan, que no supera en eficiencia a la sal y formalina como profiláctico.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) obtenidas, al comparar los tratamientos de sal y formalina (Fig. 7, 8 y 9), específicamente, en las elevadas sobrevivencias en eclosión, con las ovas tratadas con sal a 30 ppt, no concuerdan con las investigaciones hechas por Froelich y col. (1996), en *Cyprinus carpio*, quienes determinaron que el tratamiento de formalina a 250 ppm, es más efectivo que el tratamiento de sal, desde el punto de vista de prevenir el ataque fungicida y obtener elevados porcentajes de eclosión. Esto, es ratificado por las investigaciones hechas por Cline y col. (1972), Barnes y col. (1997) y Barnes y

col. (2000) que utilizaron formalina en ovas de salmón chinook y trucha arco iris, observando una reducción de mortalidad de ovas con ojo, sin determinar que dañe al embrión, logrando obtener porcentajes de sobrevivencia en la eclosión entre un 87.9 % a 93.1 %, además este tratamiento, previene y elimina efectivamente los hongos, no favoreciendo la acción de la saprolegniasis.

Estas conclusiones, son rebatidas por otras investigaciones realizadas por Waterstrat y col. (1995) y Schreier y col. (1996), al utilizar formalina en ovas de salmón chinook y trucha arco iris, concluyendo que efectivamente el tratamiento de formalina es mejor que otros químicos en prevenir y eliminar la acción de la saprolegniasis y mejorar la sobrevivencia embrionaria, logrando porcentajes de eclosión entre 90 a 98 %, pero agregando, que la aplicación de sal como tratamiento profiláctico es un óptimo químico contra la saprolegniasis, mejorando la sobrevivencia embrionaria (20 %, por sobre el control), por lo cual, este químico no se puede descartar como elemento de acción profiláctica.

Estas ultimas conclusiones, concuerdan con Marking y col. (1994) que señalan que ovas de trucha arco iris tratadas con sal a 30 ppt y formalina a 250 ppm, disminuyen los niveles de infección, mejorando los porcentajes de eclosión alrededor de un 25 % por sobre el control.

El efecto no deseado, que pudo tener la aplicación de los tratamientos de formalina y yodo, a diferencia del tratamiento de sal, puede haberse debido a que las concentraciones utilizadas (100 y 250 ppm, para el yodo y la formalina, respectivamente) tuvieron incidencia en el desarrollo del embrión a partir de la aplicación los tratamientos. Esto ultimo, se puede corroborar con los resultados de sobrevivencia larval de 15 días, obteniendo para las larvas provenientes de ovas tratadas con formalina una sobrevivencia promedio de 70.66 ± 3.05 %, y para el yodo de 58.33 ± 5.68 %, apreciando diferencias significativas ($p < 0.05$) con la sobrevivencia de las larvas provenientes de ovas tratadas con sal, que tuvo una sobrevivencia quincenal de 86.33 ± 5.13 % (Tabla 5), pudiendo señalar, y de

acuerdo a lo que obtuvo Fitzpatrick y col. (1995), con relación al efecto de la formalina, que esta tiene incidencia negativa en los peces (larvas de catfish), influyendo en el crecimiento y sobrevivencia de los peces en los primeros estados de desarrollo, después de la eclosión.

En cambio, con las larvas provenientes de ovas tratadas con sal, su sobrevivencia a los 15 días refleja que el tratamiento fue inocuo en el desarrollo de las larvas. Esto último, es corroborado por Edgell y col. (1993), que al aplicar sal como tratamiento en ovas de salmón chinook, no provocó elevados porcentajes de larvas anormales (9 %), con relación a otros compuestos como el verde de malaquita (16 %).

La positiva aplicación de sal (30 ppt) como tratamiento profiláctico, desde el punto de vista de beneficiar la obtención de grandes cantidades de ovas, con el objetivo de producir cristalinos de interés comercial, resulta tremendamente importante. Además, por las características de las ovas de *Galaxias maculatus* y por la tecnología de incubación desarrollada, resulta indispensable tener una metodología profiláctica que resguarde las producciones de ovas, y que a la vez su aplicación no sea de alta dificultad.

A pesar de los resultados obtenidos en esta investigación, su éxito esta sujeto, además, a diversas variables relacionadas con la incubación, como la calidad de las ovas y reproductores, que para esta investigación, no resultaron perjudiciales. En ese sentido, los objetivos alcanzados en esta investigación, con el tratamiento de sal, reflejados en los resultados de la sobrevivencia embrionaria en la eclosión, junto a que la aplicación de los tratamientos es de baja dificultad, y además, que el tratamiento no tiene influencia en el crecimiento de las larvas, es relevante cuando se quiere desarrollar tecnologías productivas para especies nuevas como *Galaxias maculatus*.

VI. CONCLUSIONES.

- ❖ De los tres tratamientos profilácticos, el aplicado con sal a 30 ppt, logra mejorar entre un 20-30 % por sobre el control, la sobrevivencia embrionaria a eclosión en ovas de *Galaxias maculatus*.

- ❖ El tratamiento de sal, obtiene una mejor sobrevivencia embrionaria a eclosión (90.40 ± 6.22 %, 97.20 ± 2.68 % y 96.80 ± 5.63 %, para cada bioensayo), con relación a los otros tratamientos de formalina (77.60 ± 2.60 %, 73.20 ± 5.93 % y 80.00 ± 7.74 %) y yodo (70.80 ± 3.34 %, 70.00 ± 6.92 % y 68.80 ± 8.67 %), además esto se refleja en las diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas al comparar los tratamientos.

- ❖ Como las ovas de puye, en la naturaleza, se incuban en salinidades oscilantes entre 10 a 30 ppt (Mitchell, 1991), esto reflejaría que el tratamiento de sal es el elemento más “natural” para aplicar en ovas de *Galaxias maculatus*, por los resultados de su desarrollo embrionario y sobrevivencia larval que se obtiene posteriormente.

- ❖ La sobrevivencia larval de 15 días, proveniente de ovas tratadas con sal, fue de 86.33 ± 5.13 %, obteniendo diferencias significativas ($p < 0.05$) con los demás tratamientos (70.66 ± 3.05 %, 58.33 ± 5.68 % y 74.66 ± 1.52 %, para la formalina, yodo y control respectivamente), indicando con esto, que el tratamiento profiláctico fue inocuo sobre la sobrevivencia larval.

- ❖ El procedimiento de aplicación de los tratamientos es de baja complejidad, ya que se realiza de la misma manera a como se incuban actualmente las ovas de puye, es decir, aspersándolas o rociándolas diariamente para mantenerlas húmedas. Estimando con esto, que su utilización puede ser optimizada para serla viable en ovas de *Galaxias maculatus*, de acuerdo a la tecnología de incubación que se realiza actualmente.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ AGUAYO, M. 1995. Manejo sanitario en un hatchery de *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842). Informe de Práctica Profesional, T.U.A., Universidad Católica de Temuco, Facultad de Acuicultura y Cs. Veterinarias, Temuco, Chile. 46 pp.
- ❖ BARILES, J. 1999. Incubación de *Galaxias maculatus* en Hatchery. Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.* Temuco, Chile. 24 pp.
- ❖ BARNABE, G. 1991. Acuicultura Vol. II. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España. 1099 pp.
- ❖ BARNABE, G. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España. 519 pp.
- ❖ BARNES, M., R. CORDES, W. SAYLER. 1997. Use of Formalin during Incubation of Eyed of Inland Fall Chinook Salmon. The Prog. Fish-Cult. 59: 303-306.
- ❖ BARNES, M.E., D.E. EWING, R.J. CORDES, G.L. YOUNG. 1998. Observations on Hydrogen Peroxide Control of *Saprolegnia spp.* during Rainbow Trout Eggs Incubation. The Prog. Fish-Cult. 60: 67-70.
- ❖ BARNES, M., K. WINTERSTEEN, R. CORDES, W. SAYLER. 2000. Use of Formalin during Incubation of Rainbow Trout Eyed Eggs. North American Journal of Aquaculture 62: 54-59.

- ❖ BEAKES, G.W., S.E. WOOD, A.W. BURR. 1994. Features which characterize *Saprolegnia* isolates from salmonid fish lesions? A review. In *Salmon Saprolegniasis*. Edited by G.J. Mueller. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon. 33 pp.

- ❖ BENZIE, V. 1968. Stages in the normal development of *Galaxias maculatus attenuatus* (Jenyns). *New Zealand of Marine and Freshwater Research*. 2: 606-627.

- ❖ BÓRQUEZ, A., P. DANTAGNAN. 1999. Larvicultura de *Galaxias maculatus* en un sistema intensivo de producción. *Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.** Temuco, Chile. 21 pp.

- ❖ BRUNO, D.W., B.P. WOOD. 1994. *Saprolegnia* and other Oomycetes. In *Fish Diseases and Disorders*, Publishing, Wallingford, Oxon, U. K. 60 pp.

- ❖ CAMPOS, H. 1970. *Galaxias maculatus* (Jenyns) en Chile, con especial referencia a su reproducción. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*. Chile 31: 5-20.

- ❖ CLINE, T., G. POST. 1972. Therapy for Trout Eggs Infected with *Saprolegnia sp.* *The Prog. Fish-Cult.* 34(3): 25-40.

- ❖ EDGELL, P., D. LAWSETH, W.E. McLEAN, E.W. BRITTON. 1993. The Use of Salt Solutions to Control Fungus (*Saprolegnia*) Infestations on Salmon Eggs. *The Prog. Fish-Cult.* 55: 48-52.

- ❖ ESTAY, F., H. CERISOLA, V. TELLEZ. 1994. Biología del desarrollo y reproducción artificial en la Trucha Arco Iris. Proyecto Conicyt-Fondef. Bases para los manejos reproductivos aplicados a la producción de salmónidos. Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. 125 pp.
- ❖ FITZPATRICK, M.S., C.B. SCHRECK, R.L. CHITWOOD. 1995. Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. Prog. Fish-Cult. 57: 153-155.
- ❖ FROELICH, S., T. ENGELHARDT. 1996. Comparative effects of Formalin and Salt Treatments on Hatch Rate of Koi Carp Eggs. The Prog. Fish-Cult. 58: 209-211.
- ❖ GLAVOLENA, T.P., E.M. MALIKOVA. 1968. Effect of malachite green on the composition of blood in Baltic salmon fingerlings. Rybnoe Khoziaistvo. 45(5): 15-18.
- ❖ HUSSEIN, M.M.A., S. WADA, K. HATAI, A. YAMAMOTO. 2000. Antimycotic Activity of Eugenol against Selected Water Molds. Journal of Aquatic Animal Health 12: 224-229.
- ❖ HUSSEIN, M.M.A., M.A. EL-FEKI, K. HATAI, A. YAMAMOTO. 2002. Inhibitory Effects of Thymoquinone from *Nigelia sativa* on Pathogenic *Saprolegnia* in Fish. Biocontrol Science. 7(1): 31-35.
- ❖ KINKELIN, M., P. GHITHINO. 1985. Tratado de las enfermedades en peces. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 353 pp.

- ❖ KITANCHAROEN, N., A. YAMAMOTO, K. HATAI. 1998. Effects of Sodium Chloride, Hydrogen Peroxide and Malachite Green on Fungal Infection in Rainbow Trout Eggs. *Biocontrol Science*. 3(2): 113-115.

- ❖ LAGLER, K.F., J.E. BARDACH, R.R. MILLER, D.R. MAY-PASSINO. 1984. *Ictiología*. Primera edición en Español A.G.T. Editor. S.A. Ciudad de México. 489 pp.

- ❖ LAZARO-CHAVEZ, M. 1985. Sustancias desinfectantes y drogas de utilidad en las Piscifactorías. A.G.T. Editor. S.A. Ciudad de México. 90 pp.

- ❖ MARDONES, A., C. PICCHARA, X. SALAS. 1999. Mercado y comercialización del puye, símiles y sucedáneos. Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.* Temuco, Chile. 20 pp.

- ❖ MARKING, L.L., J.J. RACH, T.M. SCHREIER. 1994. Evaluation of Antifungal Agents for Fish Culture. *The Prog. Fish-Cult.* 56(4): 209-211.

- ❖ MENDOZA, A., A. CEVALLOS, C. IGOR. 1999. Principales enfermedades encontradas en reproductores adultos de la especie puye (*Galaxias maculatus*, Jenyns, 1842), mantenidos en cautiverio. Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.* Temuco, Chile. 20 pp.

- ❖ MEYER, F.P. 1991. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* 69: 4201-4208.

- ❖ MITCHELL, C. 1991. Deposition of *Galaxias fasciatus* eggs with *Galaxias maculatus* eggs at a tidal site. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 25:201-205.

- ❖ MITCHELL, A.J., C.B. COLLINS. 1997. Review of the therapeutic uses of hydrogen peroxide in fish production. *Aquacul. Mag.* 23(3): 74-79.
- ❖ NEISH, G.A. 1977. Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 10: 513-522.
- ❖ NOVARTIS ANIMAL VACCINES LTD. 2001. Pyceze: Saprolegnia treatment approved. *Fish Farming International.* 28(12): 28-29.
- ❖ PÉREZ, L.A. 1982. *Piscicultura, Ecología, Explotación e Higiene.* Editorial El Manual Moderno, S.A., de C.V., México, D.F., México. 155 pp.
- ❖ PHELPS, R.P., C. WALSER. 1993. Effect of Sea Salt on the Hatching of Channel Catfish Eggs. *Journal of Aquatic Animal Health* 5: 205-207.
- ❖ QUEZADA, R. 1997. Determinación de la incidencia del uso de un tratamiento profiláctico durante el proceso de incubación de ovas de *Galaxias maculatus*, en términos de sobrevivencia embrionaria y larval. Informe Práctica Profesional, T.U.A., Universidad Católica de Temuco, Facultad de Acuicultura y Cs. Veterinarias, Temuco, Chile. 44 pp.
- ❖ REICHENBACH-KLINKE, H.H. 1982. *Enfermedades de los peces.* Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España. 507 pp.
- ❖ ROBERTS, R.J. 1989. *Fish Pathology, second edition.* Balliere Tindall Publishers, London. 467 pp.
- ❖ SCHREIER, T.M., J.J. RACH, G.E. HOWE. 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture.* 140 (4): 323-331.

- ❖ TAYLOR, S.G., J.E. BAILEY. 1979. Saprolegnia: control of fungus on incubating eggs of pink salmon by treatment with seawater. *The Prog. Fish-Cult.* 41: 181-183.

- ❖ VALDEBENITO, I. 1999. Manejo reproductivo del puye (*Galaxias maculatus*) en condiciones de cultivo. Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.* Temuco, Chile. 18 pp.

- ❖ VAN WATERS, INC. 1988. Material safety data sheet. Van Waters and Rogers, Inc. Seattle, WA. 40 pp.

- ❖ VEGA, R. 1999. Estado del conocimiento de la biología y ecología de *Galaxias maculatus* en Chile. Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.* Temuco, Chile. 30 pp.

- ❖ VEGA, R. 1999. Manejo de reproductores de *Galaxias maculatus*. Sem. Inter. Bases para la acuicultura del puye *Galaxias spp.* Temuco, Chile. 16 pp.

- ❖ VEGA, R., J. BARILES, I. VALDEBENITO, P. DANTAGNAN, A. BORQUEZ. 1995. Informe final Proyecto Fondecyt 1930134. Piscicultura del puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842). Investigación de sus bases biológicas y tecnológicas, etapa III. Universidad Católica de Temuco, Facultad de Acuicultura y Cs. Veterinarias, Temuco, Chile. 142 pp.

- ❖ VEGA, R., J. BARILES, I. VALDEBENITO, P. DANTAGNAN, A. BORQUEZ. 1998. Proyecto Fondef D96-1071. Investigación y desarrollo de la tecnología para el cultivo comercial de puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842). Universidad Católica de Temuco, Facultad de Acuicultura y Cs. Veterinarias, Temuco, Chile. 150 pp.

- ❖ VELASQUEZ, A. 1994. Bases preliminares para la obtención de larvas y post-larvas viables de *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) para actividades de repoblamiento. SERNAP. X Región. Chile. 50 pp.
- ❖ WALSER, A., R.P. PHELPS. 1993. The Use of Formalin and Iodine to Control Saprolegnia Infections on Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Eggs. Journal of Applied Aquaculture. 3(3-4): 269-278.
- ❖ WATERSTRAT, P.R., L.L. MARKING. 1995. Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride for the treatment of *Saprolegnia parasitica* on fall chinook salmon eggs. The Prog. Fish-Cult. 57(4): 287-291.
- ❖ WHISLER, H.C. 1996. Identification of *Saprolegnia spp.* Pathogenic in Chinook Salmon. Final Report, DE-AC79-90BPO2836, U.S. Department of Energy, Washington, D.C. 43 pp.
- ❖ WILLOUGHBY, L.G. 1994. Fungi and Fish Diseases. Pisces Press, Stirling, Scotland. 57pp.
- ❖ WILLOUGHBY, L.G., R.J. ROBERTS. 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. J. Fish Diseases 15: 1-13.