



Portada Interna de Tesis

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



Establecimiento de una colonia de *Lehmannia valentiana* como modelo para estudios de embriología comparada y regeneración

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciatura en Biología

Presenta:

Elisa Téllez Chávez

Dirigido por:

Dr. Alfredo Varela Echavarría

SINODALES

Alfredo Varela Echavarría

Presidente

Firma

Fausto Arellano Carbajal

Secretario

Firma

Raúl Francisco Pineda López

Vocal

Firma

Juan Campos Guillén

Suplente

Firma

Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Suplente

Firma

Jaime Ángeles Ángeles

Director de la Facultad

Humberto Suzán Aspíri
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
20 de Octubre del 2011
México

RESUMEN

El estudio del desarrollo del plan corporal de los Metazoarios ha permitido identificar elementos genéticos que han sido seleccionados por poseer un valor adaptativo en dicho proceso y que se han conservado en las diversas taxas que constituyen este grupo. El estudio del desarrollo de invertebrados actualmente se realiza principalmente en especies modelo como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Los moluscos son un grupo importante de macroinvertebrados y su desarrollo embrionario es hasta ahora muy poco conocido. Con el fin de contribuir al entendimiento del desarrollo, ciclo de vida y regeneración del grupo, iniciamos el estudio de un miembro de la familia Limacidae, *Lehmannia valentiana* (Mollusca, Gasterópoda, Pulmonata, Stylommatophora), un gasterópodo pulmonado terrestre y hermafrodita. Determinamos las condiciones adecuadas para su sobrevivencia y reproducción que incluyen humedad, alimento, sustrato, temperatura y luz. Además llevamos a cabo estudios iniciales de su ontogenia a fin de generar un catálogo de los diferentes estadios de desarrollo. También se llevaron a cabo estudios de histología que demuestran la regeneración de la cola después de su amputación. Por otra parte, llevamos a cabo estudios preliminares en los que observamos que por ayuno prolongado los adultos de esta especie pueden reducir su tamaño hasta en un 70% lo que nos permite utilizarlo como modelo para estudios de alometría. Esperamos que la información derivada de este estudio sirva de base para análisis ontogénicos comparativos de este grupo con otros metazoarios.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, regeneración, alometría.

SUMMARY

The study of development of the body plan metazoans has identified genetic elements that have been selected for having an adaptive value in that process and that have been preserved in the various taxa that make up this group. The study of invertebrate development currently takes place primarily in model species such as the nematode *Caenorhabditis elegans* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Molluscs are an important group of macroinvertebrates and their embryonic development is so far little known. To contribute to the understanding of development life cycle and regeneration of the group, began the study of a family member Limacidae, *Lehmannia valentiana* (Mollusca, gastropod, Pulmonata, Stylommatophora), a terrestrial pulmonate gastropod and hermaphrodite. We determine the conditions for their survival and reproduction that include humidity, food, substrate, temperature and light. In addition we conducted initial studies of its ontogeny to generate a catalog of the different stages of development. Were also carried out histological studies demonstrating the tail regeneration after amputation. In addition, we conducted preliminary studies we observed that prolonged fasting adults of this species of allometry. We hope the information derived from this study provide a basis for comparative ontogenic analysis of this group with other metazoans.

Key words: Embryonic development, regeneration, allometry.

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Indice	v
Indice de cuadros	vi
Indice de figuras	vii
I. INTRODUCCION	
II. REVISION DE LITERATURA	
Gasterópodos terrestres	
Ecología de gasterópodos	
Fotoperiodo	
Histología	
Alometría	
III. METODOLOGIA	
Lugar de colecta	
Colecta del material de estudio	
Establecimiento de la colonia en condiciones de laboratorio	
Determinación de la especie	
Descripción del sujeto experimental	
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	
Establecimiento de la colonia en condiciones de laboratorio.	
Determinación de la especie	
Descripción del sujeto experimental	
LITERATURA CITADA	
APENDICE	

INDICE DE CUADROS

Cuadro

Página

INDICE DE FIGURAS

Cuadro		Página
01	Adaptación de malla de fibra de vidrio en las tapas de los contenedores para permitir la ventilación del aire.	7
02	Sustratos probados durante el establecimiento de la colonia	8
03	Diferentes alimentos probados en los gasterópodos durante el establecimiento de la colonia.	10
04	Condiciones finales de la colonia establecida de <i>Lehmannia valentiana</i> .	14
05	Morfología interna de babosas terrestres.	15
06	Esquema de tipos de dientes radulares de <i>Lehmannia valentiana</i> .	16
07	Fotografías de microscopía electrónica donde se observa la morfología de los dientes radulares.	17
08	Morfología externa de <i>Lehmannia valentiana</i> .	18
09	Caracterización de los estadios embrionarios de <i>Lehamnnia Valentiana</i> .	19

I. INTRODUCCIÓN

El estudio del desarrollo del plan corporal de los Metazoarios permite el conocimiento de patrones evolutivos en la ontogenia de los diversos grupos (Brusca y Brusca, 2005b). Dentro del grupo de los metazoarios, los moluscos son en apariencia, anatomía, ecología y fisiología un grupo muy diverso (Barker, 1999) y conforman un porcentaje significativo, incluyendo algunos macroinvertebrados más conocidos como caracoles, almejas, babosas, calamares y pulpos (Brusca y Brusca, 2005b). Una característica destacada para estudios evolutivos de estos organismos es que incluidos los artrópodos y los gusanos (Gilbert, 2006), presentan un desarrollo embrionario similar al de los protostomados, donde el blastoporo da lugar a la boca y a diferencia de estos grupos, los moluscos presentan una segmentación espiral (Brusca y Brusca, 2005a), por lo que el conocimiento de los mecanismos embrionarios permitirá diferenciar y distinguir cambios evolutivos entre filos de metazoarios.

Las babosas terrestres son gasterópodos pulmonados (Subclase Pulmonata) pertenecientes al Orden Stylommatophora (Brusca y Brusca, 2005b), dominante por su riqueza de especies en moluscos pulmonados (Barker, 1999). Son descritas como caracoles sin concha o se dice que tienen una concha reducida (Henderson and Triebkorn, 2002; Barker, 1999), tienen dos pares de tentáculos en la cabeza, ópticos y sensoriales (Goh *et al*, 2003). La boca se sitúa entre y por debajo de los tentáculos, presentando una rádula, misma que utilizan para raspar el alimento (Goh *et al*, 2003) y es una característica morfológica que se utiliza para diferenciar entre especies de babosas mediante el conteo del número y forma de dientes que componen la rádula (Brusca y Brusca, 2005b).

Las babosas son consideradas plagas de importancia económica para la agricultura por el daño que causan en cultivos agrícolas y jardines ornamentales (Clemente *et al*, 2007; Henderson and Triebkorn, 2002; Moreno *et al*, 2008; Mc Donnell *et al*, 2009). Es por ello que con el fin de establecer estrategias para su control y manejo de su efecto como plagas, ha resultado esencial disponer de información acerca de sus ciclos de vida (Clemente *et al*, 2007). Sin embargo, la mayor parte de estas investigaciones se han enfocado a la ecología de la especie y no se han tomado en cuenta aspectos moleculares y del desarrollo de estas.

Para sobrevivir y reproducirse las babosas requieren de condiciones adecuadas de humedad, alimento, temperatura y luz (Goh *et al*, 2003). Estos factores también interfieren

con el número de huevos por puesta, la variación en el tiempo de eclosión y la fertilidad de los mismos (Clemente *et al*, 2007). Son organismos hermafroditas (Goh *et al*, 2003); y algunos tienen la capacidad de autofecundarse, lo que ha sido útil en el desarrollo de otros modelos para el estudio de desarrollo, como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974).

Este grupo reviste particular importancia por su ubicación filogenética entre los metazoarios y porque se conoce muy poco del control molecular de su desarrollo. Con el fin de contribuir al entendimiento del desarrollo, ciclo de vida y regeneración del grupo, estudiaremos a un miembro de la familia Limacidae, *Lehmannia valentiana*. Además, la información derivada de este estudio servirá de base para análisis ontogénicos comparativos de este grupo con otros metazoarios.

Estudios previos dentro del laboratorio con la especie *Lehmannia valentiana* y estudios de otros grupos con otras especies han demostrado que al cortar la cola y el ojo de babosas, este tejido se regenera y que durante periodos de hambruna las babosas disminuyen su tamaño. Estos mismo procesos ocurren y han sido observados en planarias como *Schmidtea mediterranea* (Sánchez, 2003), abriendo la posibilidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la regeneración de tejidos en este modelo.

Objetivos

- Establecer una colonia de *Lehmannia valentiana* bajo condiciones de laboratorio.
- Caracterizar los diferentes estadios del desarrollo embrionario en *Lehmannia valentiana*.
- Caracterizar el proceso de regeneración y la alometría en adultos de *Lehmannia valentiana*.

Hipótesis

- Las condiciones más aptas para el establecimiento de la colonia dentro del laboratorio serán similares a las que presenta el lugar de colecta de *Lehmannia valentiana*.
- La especie *Lehmannia valentiana* es un buen modelo para estudiar la regeneración.

- Por un periodo prolongado de ayuno, se observarán cambios significativos en el peso y tamaño de la especie *Lehmannia valentiana*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

GASTERÓPODOS TERRESTRES

El grupo de los moluscos es de los más grandes que conforman el reino animal (Fretter and Graham, 1994). Entre estos, los gasterópodos como babosas y caracoles son un grupo muy diverso, con aproximadamente 35 000 especies y aunque la mayoría de estos son marinos, abundan en hábitats terrestres y de agua dulce (Barker, 1999).

El término ‘babosa’ se refiere a aquellos moluscos que presentan una concha reducida o la han perdido por completo (Barker, 1999). Esto se debe a un proceso evolutivo denominado limacización, que puede ocurrir tanto en gasterópodos marinos así como terrestres, en el cual el sacrificio de la protección por medio de la concha les proporciona mayor movilidad y habilidad de ocupar espacios más pequeños, esto es debido a que el número de espirales de la concha de un caracol se ve reducido (Barker, 1999).

En general el sistema excretor de las babosas que pertenecen a los Stylommatophora, consiste en un riñón paleal, el cual recibe los desechos provenientes del pericardio a través de un nefrostoma, expulsando los desechos a través de un nefroporo a un uréter, variable entre los taxos (Barker, 1999). Hay una extensa vascularización por parte de la vena pulmonar en la mayor parte de la superficie paleal entre el riñón y el pneumostoma, llamado así el sitio de intercambio de gases respiratorios (Baker, 1999).

El pneumostoma es contráctil, al abrirse el diafragma se contrae para permitir la dilatación de la cavidad pulmonar y extraer el aire. El cierre y relajación de éste producen una presión dentro de la cavidad, facilitando el intercambio gaseoso a través de la red venosa del techo de la cavidad pulmonar, esto ocurre cíclicamente (Baker, 1999).

El sistema digestivo de los moluscos que pertenecen al orden Stylommatophora, se comprende por el aparato bucal, el esófago y el estómago, con dos lóbulos que abren y cierran de la glándula digestiva y el intestino. El aparato bucal esferoidal, se comprende por un complejo de músculos que extiende y contraen la rádula y la mandíbula (Baker, 1999).

Un rasgo característico de los moluscos es la rádula, esta forma una lengua con pocos o muchos dientes en fila, formados por grupos de células especializadas llamadas odontoblastos. Cuando un limácido se alimenta, la rádula sobresale de la boca en algunas especies y luego se retrae. Este sistema vestibular realiza la abrasión, corte y la ingestión de la materia orgánica, por medio de la rotación de la membrana sobre la cara anterior de la rádula, haciendo que se eleven los dientes anteriores para permitir que raspen, perforen, corten y rompan el alimento, produciendo trozos lo suficientemente pequeños para ser tragados (Baker, 1999). Conforme la rádula se desarrolla, hay filas de dientes que se forman de tal manera que al momento de elevar para alimentarse, cada uno se apoya en la placa basal de los dientes adyacentes en la misma fila o en la siguiente, lo que permite el reemplazo de los dientes desgastados por nuevos y reduce el riesgo de que sean arrancados de la membrana cuando entran en contacto con algún sustrato duro (Baker, 1999).

Por lo general, en cada fila transversal de dientes es posible reconocer un diente central, también conocido como diente de mediana o raquídea, situado en el centro del eje longitudinal de la rádula y suele ser simétrico en la forma de la placa base y la cabeza del canino. A cada lado de la misma fila transversal, se encuentra rodeado por muchos dientes laterales, generalmente asimétricos, con una placa basal y la cúspide más desarrollada hacia el lado del diente más cercano al eje de la rádula. Estos dientes, son flanqueados por una serie de dientes marginales, asimétricos en la mayoría de los casos, extendidos hacia los márgenes de la cinta radular.

La distribución de muchas especies de babosas se ha favorecido a causa del comercio humano (Baker, 1999).

Como consecuencia de la actividad humana, el hábitat natural de los gasterópodos ha sido destruido, lo que ha originado que estos se adapten a nuevas condiciones habituándose en los sitios donde el hombre se ha instalado, por lo que han llegado a ser plagas de importancia agrícola, causando daño a los cultivos y también cumplen un rol importante de transmisión de parásitos para el hombre, así como efectos adversos en la flora y fauna nativa (Barker, 1999).

Los caracoles necesitan una profundidad de suelo de 2 pulgadas para colocar huevos (Thompson and Cheney, 1996).

Cerca del 99% de la actividad de los caracoles y su alimentación ocurre en la oscuridad y en un ambiente fresco, con un pico 2 o 3 horas después de que ha oscurecido, estimulando su actividad por el rocío nocturno y facilitando su movimiento (Thompson and Cheney, 1996).

Los moluscos terrestres cumplen el papel de principales hospederos para algunas especies de tremátodos (Kingston, 1966).

FOTOPERIODO

El fotoperiodo es una señal que se relaciona con las épocas del año, influyendo temporalmente en el control reproductivo de los animales (Udaka y Numata, 2008; Goldman *et al*, 2004). En algunos invertebrados como los insectos los cambios en el fotoperiodo regulan patrones del comportamiento, siendo lo más característico las bajas condiciones invernales que cesan el desarrollo y reproducción de estos (Goldman *et al*, 2004).

En respuesta a las bajas temperaturas del invierno y las cortas horas de luz, hibernan durante esta temporada (Thompson and Cheney, 1996). Mientras que se ha observado que el incremento de horas luz aumenta la puesta de huevos (Thompson and Cheney, 1996).

DESARROLLO EMBRIONARIO

La mayoría de los metazoarios poseen simetría bilateral y tres capas germinales, lo que hace que sean conocidos como Bilateria y se clasificados en protostomas y deuterostomas (Gilbert, 2006).

Los protostomas son llamados así puesto que durante la gastrulación la boca se forma primero, en o cerca de la apertura del intestino y el ano se forma más tarde en otra localización (Gilbert, 2006). El celoma, o también llamado cavidad corporal, de estos animales se forma debido al ahuecamiento hacia afuera de un cordón sólido de células mesodérmicas (Gilbert, 2006).

Los protostomados pueden dividirse en dos ramas principales, los ecdisozoos, que incluye a los animales que mudan su esqueleto exterior, donde el principal grupo que lo constituye es el de los artrópodos y también está conformado por el de los lofotrocozoos, un

grupo caracterizado por un tipo espiral de segmentación, por tener una forma larval común y un aparato de alimentación distintivo, incluyendo gusanos planos, briozoos, anélidos y moluscos (Gilbert, 2006).

Por otro lado, a diferencia de lo protostomas, en los deuterostomas la apertura oral se forma después de la apertura anal y la mayoría forma sus cavidades corporales a partir de bolsas mesodérmicas que se extienden desde el intestino. Aquí se incluyen a los cordados y los equinodermos (Gilbert, 2006).

La segmentación holoblástica espiral es característica de en la mayoría de los moluscos, difiriendo de la segmentación radial porque el plano de segmentación no es paralelo o perpendicular al eje animal-vegetal del cigoto, en vez de ser así, la segmentación es en ángulo oblicuo, formando una disposición e espiral de las blastómeras hijas. Y por otro lado, las células se tocan entre sí en más lugares que en el caso de los embriones que se segmentan radialmente (Gilbert, 2006). Y por último es posible seguir el destino de cada célula de la blástula, ya que experimentan pocas divisiones antes de comenzar la gastrulación.

En el embrión, la rádula de los pulmonados surge en áreas separadas que contienen hileras longitudinales de dientes (Baker, 1999).

HISTOLOGÍA

Los diferentes tipos celulares conocidos se encuentran organizados y distribuidos en cuatro tipos básicos de tejidos que son epitelio, tejido conjuntivo, músculo y tejido nervioso.

ALOMETRÍA

Gould (1965) define a la alometría como las diferencias en la proporción y los cambios presentes en magnitudes morfológicas, fisiológicas o químicas, del organismo total o de partes específicas.

III. METODOLOGÍA

Lugar de colecta.

Los individuos fueron colectados de una jardinera particular conformada por crasuláceas, plantas ornamentales y tierra rica en materia orgánica. El lugar de colecta se localiza al noroeste de la ciudad de Querétaro, municipio de Querétaro. Ubicado geográficamente entre las coordenadas: 100°27' de longitud Oeste y 20°42' de latitud Norte. Esta zona se encuentra a una altura por arriba de los mil metros sobre el nivel del mar y presenta un clima templado semiseco.

Colecta del material de estudio.

La colecta de la especie se realizó durante los meses de Junio del 2010 a junio del 2011, extrayéndolos de una jardinera particular, utilizando un popote y fueron colocados en un recipiente cilíndrico plástico, de 18 cm de diámetro por 23cm de altura, que contenía tierra húmeda de la jardinera del sitio de colecta.

Establecimiento de la colonia en condiciones de laboratorio.

El establecimiento de la colonia se llevó a cabo dentro del laboratorio A-03 del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro.

Para los terrarios se emplearon contenedores de plástico y de vidrio de distintos tamaños para observar las preferencias y la adaptación entre los adultos reproductivos. En la tapa de los recipientes de plástico se hizo un agujero de 1cm de diámetro y se cubrió con dos capas de malla de fibra de vidrio, una plana bloqueando el agujero y otro en forma de cono para evitar el bloqueo de la entrada de aire por la saturación de moco de los limácidos (figura 1).

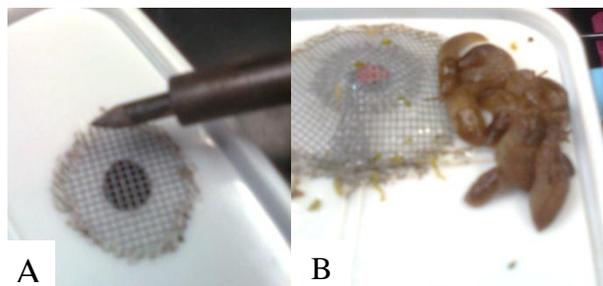


Figura 1. Adaptación de malla de fibra de vidrio en las tapas de los contenedores para permitir la ventilación del aire. A. Primer capa con malla para cubrir el agujero. B. Cono de malla para evitar el bloqueo de la entrada y salida de aire por el moco producido por los limácidos.

De igual manera, para los huevos se utilizaron recipientes de plástico y vidrio para observar cambios en el desarrollo de éstos y fue colocada en los orificios de las tapas una tela porosa delgada para permitir la ventilación dentro de los recipientes y evitar la salida de las crías al nacer.

Los sustratos utilizados fueron de origen orgánico e inorgánico. Para el primero de los casos se probó con tierra proveniente de la jardinera de donde fueron colectados los babosas, por ser parte del hábitat de los limácidos; se utilizó tierra rica en materia orgánica, comúnmente utilizada en macetas y para plantas ornamentales (figura 2a), también se utilizó vermicompost (humus de lombriz), previamente tamizado para eliminar pedazos grandes de materia orgánica (Figura 2b). Además, se colocó a manera de sustrato pasto (figura 2c) proveniente de una jardinera particular. Para el uso de sustrato inorgánico, se empleó vermiculita (Sunshine), un mineral formado por silicatos de hierro y magnesio que contiene pequeñas partículas absorbentes que no se compactan y cuentan con la capacidad de retener agua y nutrientes (Figura 2d). Antes de utilizar cada uno de los sustratos fueron previamente esterilizados en autoclave a excepción del pasto y se verificó que la profundidad del sustrato en cada terrario fuera de 1.5 a 2 cm.

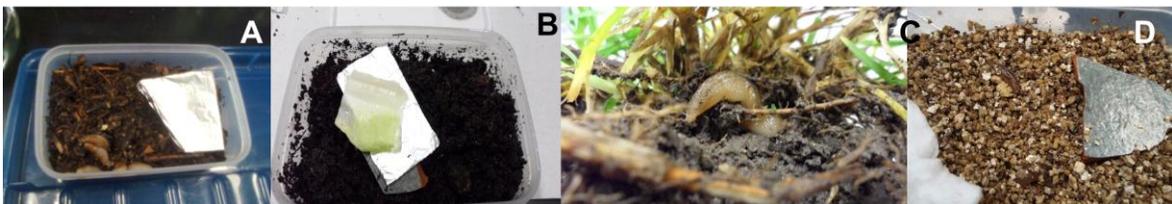


Figura 2. Sustratos probados durante el establecimiento de la colonia. A. Tierra de maceta, B. Vermicompost, C. Pasto, D. Vermiculita (Sunshine)

Para evitar el daño de los huevos por los movimientos causados por los adultos y el roce del sustrato con estos, fueron colocados en recipientes aparte, y se determinaron las condiciones para observar el desarrollo de los huevos, de acuerdo a distintas adaptaciones. Fueron colocados entre tierra de maceta estéril bajo un pedazo de loza húmedo y entre vermiculita estéril debajo de un pedazo de loza húmedo. Ya que en su hábitat las puestas son colocadas entre o sobre hojas secas, se colocaron algunos huevos sobre hojas secas de

árboles como *Ficus elástica* y *Eucalyptus camaldulensis*, las cuales fueron humedecidas con un atomizador, en algunos casos fueron cubiertas con otra hoja. Para disminuir la posibilidad de que se presentaran plagas como en el caso de los adultos, se descartó el material orgánico y se utilizó algodones y papel filtro húmedos en los terrarios. Algunos huevos fueron colocados sobre algodón húmedo, cubiertos con una capa delgada de algodón húmedo y otros sin cubrir. Otros fueron colocados sobre papel filtro húmedo que tuviera debajo un algodón húmedo, en otros casos bajo el papel filtro se colocó una capa de 1cm de vermiculita estéril y en otro de los casos, los huevitos fueron cubiertos con una capa delgada de algodón.

A pesar de ser gasterópodos terrestres, las babosas requieren de humedad, para ello los terrarios fueron humedecidos con agua de la llave hervida previamente para eliminar restos de cloro. De acuerdo al tipo de sustrato, las cantidades de agua variaron de manera que el sustrato se encontrara húmedo, mas no mojado por medio de un atomizador de plástico.

Ya que la dieta de las babosas se basa principalmente en plantas, a eso se debe el que sean famosas por ser plagas importantes de cultivos agrícolas, fueron alimentadas con hojas de lechuga hidropónica y del tipo regada con agua de pozo profundo (figura 3a), para evitar cualquier infección por pesticidas o plagas, y también se les dio repollo para determinar cuál de estas dos eran de su preferencia. Las hojas de lechuga y repollo fueron colocadas los días lunes, miércoles y viernes, para ser retiradas al día anterior y así evitar su descomposición por estar mucho tiempo dentro del terrario. Ya que las babosas terrestres son famosas por ser plagas del frijol, se germinaron plantitas de frijol (figura 3b) dentro del laboratorio en frascos de vidrio para colocarlas en los terrarios. También fueron alimentadas con *Aptenia cordifolia* (figura 3c), perteneciente a la familia de las Aizoaceae, una planta ornamental de la que se alimentaban principalmente en su lugar de colecta y finalmente, en su dieta a base de plantas, se probó con pelets de alfalfa para conejo (fig 3d). Por otro lado, para proporcionarles una dieta balanceada se les dio a comer hígado crudo de rata (fig 3e), aproximadamente 0.020 gr por individuo y también se les proporcionó pelets para rata (Rat Chow, apéndice 1, fig 3f) y de alimento para plecostomus (fig 3g).



Figura 3. Diferentes alimentos probados en los gasterópodos durante el establecimiento de la colonia. A. hojas de lechuga, B. plantas de frijol, C. *Aptenia cordifolia*, D. pelets de alfalfa, E. hígado de rata, F. Rat chow, G. Pleco Sticks.

Los moluscos requieren de calcio para producir una concha fuerte, una carencia de este probablemente hará que su concha sea débil, provocando su ruptura, es por ello que se les proporcionó una vez al mes pastillas de carbonato de calcio.

A manera de bebederos, dentro de los terrarios fueron colocados algodones húmedos, previamente hervidos en agua de la llave.

Para establecer el fotoperiodo se colocó dentro la incubadora un foco ahorrador de luz blanca de 11 watts (120 voltios), conectado a un timer, con un ajuste inicial de 14 horas luz y 10 horas noche y otro ajuste de 12 horas luz y 12 horas noche, para observar si el número de puestas y huevos aumentaba o disminuía para cada uno de los casos.

Para el ajuste de la temperatura se realizaron pruebas desde 16 a 23° C, por periodos de dos semanas para observar en que valor se llevaba a cabo el desarrollo embrionario.

Otras adaptaciones diseñadas para los terrarios, fue la colocación de pedazos de mosaicos y tapas de tubos Falcon (50 ml) con un agujero hecho en el borde, previamente hervidos en agua de la llave para que los limácidos se ocultaran de la luz, por ser de hábitos nocturnos. Y se diseñaron unos platos con pedazos de aluminio para colocar el alimento y así evitar que se ensuciaran los terrarios.

Determinación de la especie

Para determinar la especie nos basamos en la guía de identificación de Pearce y colaboradores (2004). Por otro lado, se realizó una disección de una babosa de

aproximadamente 3 mese de edad, para exponer sus órganos internos y compararlos con lo descrito por otros autores para esta especie, por lo que se tomaron fotos.

De acuerdo a Barker (1999), la forma, amaño y el número de dientes en cada fila radular transversal, son útiles para identificar a las especies del orden Stylommatophora, por lo que otro método realizado para determinar a nuestra modelo de estudio fue comparar fotos de los dientes de la rádula con los descritos por Castillejo (1982) y Barker (1999). La extracción de la rádula se realizó con ayuda de la Dra. Eréndira Gorostieta Hurtado, en organismos adultos fijados en paraformaldehído al 3.5%. Para ello, fue depositado en una caja petri y se retiró el manto con unas tijeras de disección, cortando en línea recta la piel desde la boca, a la parte posterior del manto y poco a poco fue retirado el tejido interno por capas hasta localizar la rádula. Una vez localizada fue extraída con cuidado de no dañarla por su naturaleza frágil y para posteriormente tomar fotos de esta. Fue colocada en un frasco con agua de la llave, realizando lavados para evitar la presencia de impurezas en la muestra.

Una vez extraída y lavada la rádula se procedió a realizar su montaje. Para ello fueron proporcionados portamuestras por la M en I.Q. Alicia del Real López. Estos fueron lavados con agua y jabón y se dejaron secar. Una vez secos se limaron con brazo y fueron colocaron en un frasco con acetona durante 10 minutos en un sonicador de baño (Fisher Scientific Model FS140) del laboratorio B01 del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Una vez separados de la acetona y secos, se les colocó un pedazo de cinta carbón en una cara del cilindro del portamuestras y sobre esta se acomodó la rádula. Una vez montadas las muestras, fueron llevadas al Laboratorio de Microscopía del CFATA UNAM para tomarles fotos.

Desarrollo embrionario

Para caracterizar los estadios del desarrollo de *L. valentiana* fueron fijados algunos estadíos y se les sacó foto para capturar el desarrollo. Estos fueron colocados en agua de la llave y se retiraron las capas de huevo, para obtener el puro embrión y una vez que no se presentaba movimiento, se tomaron las respectivas fotos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de la colonia en condiciones de laboratorio.

Las condiciones favorables para el sistema de cultivo del establecimiento y producción de *Lehmannia valentiana* dentro del laboratorio fueron establecidas de acuerdo a las siguientes características.

Los limácidos fueron colocados finalmente en distintos tipos de contenedores de plástico. Para los adultos reproductivos se utilizaron recipientes de 567 cm³ (9cm x 14cm x 4.5cm), colocando de 2 a 7 individuos por caja.

Después de 9 meses determinando las condiciones de las cajas de cría, los huevos se colocaron en recipientes de 198 cm³ (5.5cm x 9cm x 4cm), sobre papel filtro y se colocó debajo un pedazo de algodón húmedo previamente hervido para eliminar impurezas y el cloro del agua. Una vez que las crías nacen son colocadas en un recipiente del mismo tamaño (198 cm³), dejando no más de 21 por caja, de lo contrario se ha observado que mueren de acuerdo a una mayor demanda de oxígeno por cada una de las crías.

Por su origen orgánico y la humedad en los terrarios, los sustratos como vermicompost, la tierra de la jardinera, la tierra para maceta y el pasto fueron eliminados, ya que se presentaron plagas como hongos, nemátodos, ácaros y protozoarios, la mayoría de estos son parásitos de gasterópodos, provocando la muerte de los individuos, siendo descartados también para los huevos, por la presencia de parásitos y de taninos presentes en la materia orgánica y en las hojas secas. La vermiculita por ser de material natural e inorgánico y con alta capacidad de retención hídrica, su uso como sustrato en los terrarios fue efectivo para conservar la humedad del suelo por más tiempo y evitar los excesos de agua dentro de estos y por ser de origen mineral la probabilidad de que se presentaran estas plagas fue casi nula.

Para el sustrato vermiculita, la humedad adecuada cada que se hacen cambios de terrarios sucios por limpios, es de 3 mililitros de agua de la llave hervida, por cada 1 gramo de vermiculita. Es importante que el medio se vea húmedo y no mojado ya que la cantidad excesiva de agua favorece la presencia de parásito y la disminución de la colonia.

Por la naturaleza del hábitat y de la especie *Lehmannia valentiana*, la presencia de plagas se presentó de manera natural desde la coleta de los individuos. Utilizando para el control de los nematodos Albendazol, un antihelmíntico de amplio espectro y de

administración oral. Por la dificultad de administrar oralmente una dosis exacta a cada individuo infectado, se aplicó 0.0022gr de albendazol, por cada gramo de sustrato en cada terrario con limácidos infectados. Y en ocasiones se aplicó una dosis de Mebendazol de 0.0027gr por cada gramo de vermiculita. Para atacar a los protozoarios se aplicó una dosis de 0.0055gr de Metronidazol por cada gramo de vermiculita agregado en el terrario.

Una de las variables más importantes para establecer y mantener a la colonia fue buscar un alimento que les proporcionara una alimentación adecuada y balanceada, en términos ecológicos, que les proporcionara la energía que requiere un organismo para reproducirse y así se viera favorecido el desarrollo.

A pesar de que los gasterópodos terrestres son bien conocidos por ser plagas de muchas plantas de interés agrícola, los frijoles cultivados dentro de los terrarios, fueron ignorados por los limácidos y ya que presentaron un hongo en las raíces, fueron descartadas. Las hojas de lechuga y repollo se eliminaron de la dieta al observar la presencia de protozoarios en el medio y en cada puesta de huevos. En su hábitat de colecta se observó que se alimentaban principalmente de *Aptenia cordifolia*, pero al introducir esta especie dentro de su dieta, no fue tomada en cuenta por ninguno de los individuos adultos, por lo que fue descartada. El hígado de rata fue descartado, ya que la descomposición de éste atraía parásitos como moscas, y la demanda de atención y tiempo para retirar el hígado en descomposición, no permitía que fuera extraído de inmediato y los moluscos se alimentaban de esto.

Para el caso de los peletes, la humedad del terrario y proporcionada por la baba de los limácidos al alimentarse, cumple un papel importante para su mantenimiento y descomposición dentro del terrario. Los pelets de alfalfa eran invadidos por un hongo al día siguiente de dejarlos como alimento. Para el caso de los pelets de rata (Rat Chow), la presencia de hongo y descomposición de estos, se observó a los 6 días de ser colocados dentro de los terrarios, sin mencionar que hay una mayor preferencia hacia éste alimento por parte de las babosas, mientras que el alimento para plecostomus, se conserva libre de hongos después de 4 días. Es por esto, por la conservación dentro del terrario y aporte nutricional, que los limácidos son alimentados los días lunes y miércoles con pelets para plecostomus y los viernes con pelets para rata.

Una señal importante para la velocidad y maduración reproductiva de los animales es el fotoperiodo, para el cual se ajustó dentro de una incubadora por medio de un timer conectado a un foco ahorrador de 11 watts (figura 4a), quedando con 12 horas día y 12 horas noche. Para el caso del fotoperiodo ajustado a 14 hrs día y 10 hrs noche, el número de puestas fue menor al obtenido con el valor antes mencionado.

Otro factor fundamental en la reproducción y desarrollo de los embriones es la temperatura, siendo la más favorable a 18° C tanto para la reproducción de las babosas adultas, como para el desarrollo embrionario. Dicha variable hace de éste, un buen modelo para estudios en biología del desarrollo.

Ya que los gasterópodos permanecen ocultos del sol a lo largo del día, se colocaron pedazos de mosaicos y tapas de tubos Falcon dentro de los terrarios. Así mismo para disminuir la probabilidad de que se ensucien los recipientes, la comida es colocada en platos hechos con pedazos de aluminio, para evitar que el alimento se disperse y descomponga sobre el sustrato o el papel filtro a causa de la humedad.

Una vez establecidas las variables para mantener a los gasterópodos dentro del laboratorio (figura 4b), como el sustrato, fotoperiodo, humedad, alimento y temperatura, es necesario cambiar todo el terrario por material limpio o estéril cada 2 semanas, después de este tiempo se observó que algunos individuos comienzan a morir por el exceso de eses en descomposición.

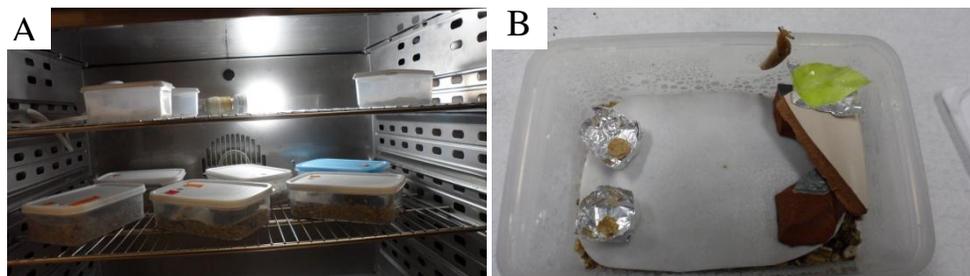


Figura 4. Condiciones finales de la colonia establecida de *Lehmannia valentiana*. En A se observan los terrarios dentro de la incubadora a 18° C y la adaptación del foco para manipular el fotoperiodo dentro de la incubadora. En B se observa el modelo final del terrario, con todas sus adaptaciones.

Determinación de la especie

En base a la Guía de Identificación de Pearse y colaboradores (2004) la especie fue identificada como *Lehmannia valentiana*. Sin embargo, es muy común que se confunda esta especie con otra conocida como *Limax maximus* o babosa gigante de jardín, como se le nombra vulgarmente, ya que presenta un patrón de manchas circulares (Langlois, 1965) que en ocasiones forman dos bandas dorsales a lo largo del su cuerpo, similares a las de *L. valentiana*.

Por lo anterior, se comparó por medio de fotos y esquemas, la morfología interna de *L. valentiana* con otras especies de babosas como *Deroceras reticulatum* y *Limax flavus* (figura 5) (Moreno *et al*, 2008).

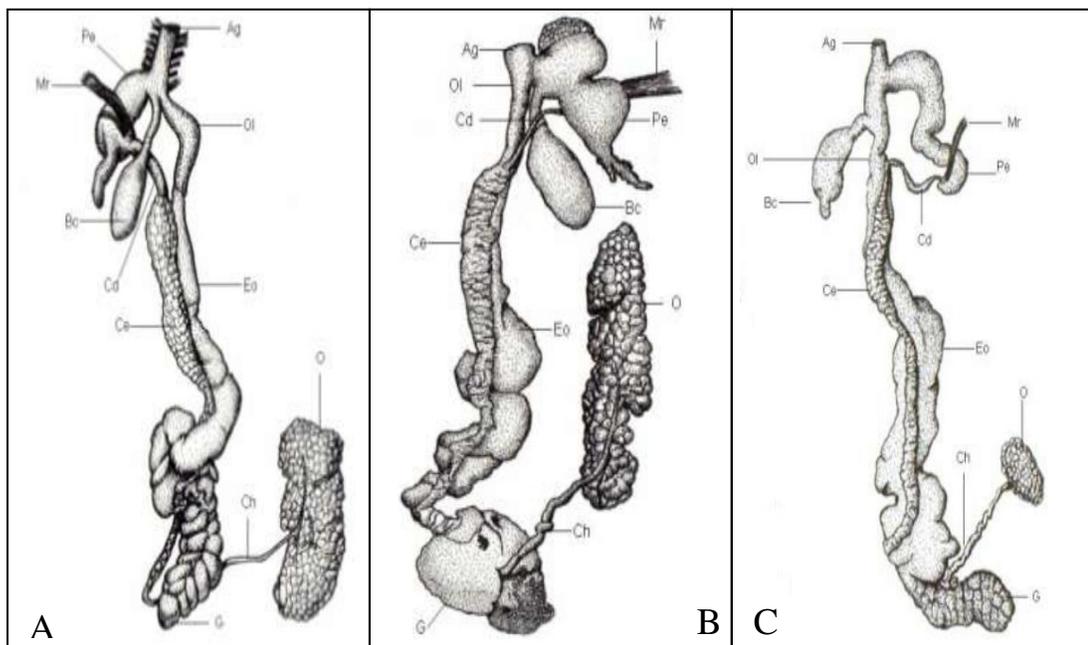


Figura 5. Morfología interna de babosas terrestres. A. *Lehmannia valentiana*; B. *Deroceras reticulatum*; C. *Limax flavus*. Donde **Ag**: atrio genital; **Bc**: bolsa copulatrix; **Ce**: Canal espermático; **Cd**: conducto deferente; **Ch**: canal hermafrodita **Eo**: Espermoviducto; **G**: glándula de albúmina; **Mr**: músculo retractor del pene; **O**: ovotestis; **Ol**: oviducto libre; **Pe**: pene. (Moreno *et al*, 2008)

La disposición de los dientes en la rádula constituye un importante aspecto taxonómico de muchos gasterópodos, por lo que esto aportó la información suficiente para determinar a la especie. De acuerdo a la morfología radular propuesta por Castillejo (1968) y por Barker (1999) se comprueba que la especie de estudio efectivamente es *Lehmannia valentiana*, por la similitud entre la morfología de dientes como se observa en la figura 6.

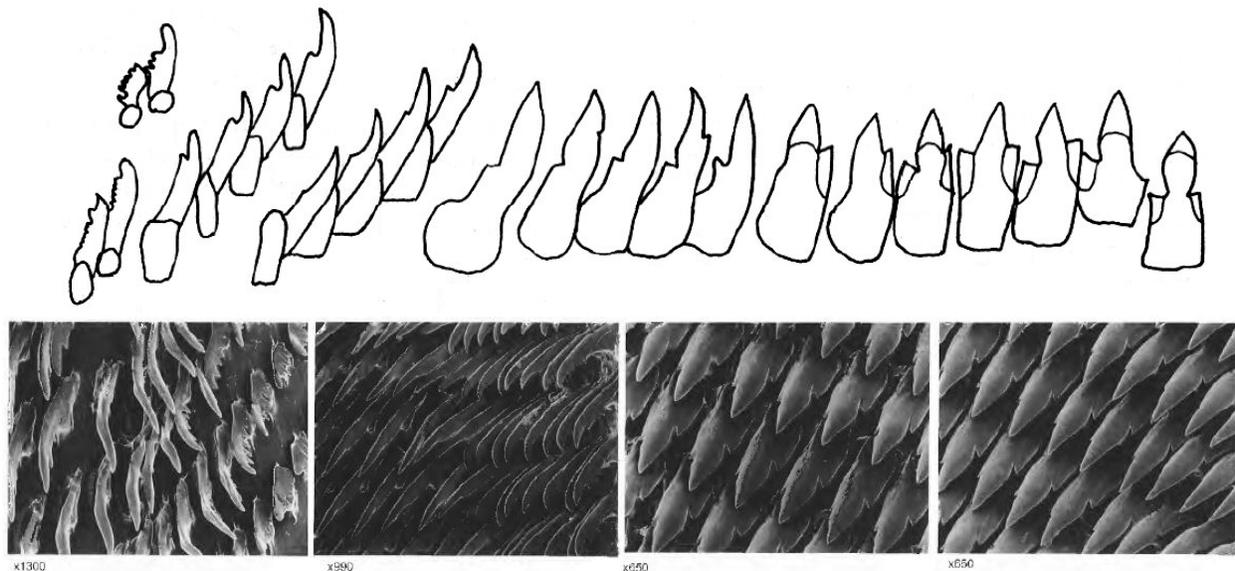


Figura 6. Esquema de tipos de dientes radulares de *Lehmannia valentiana*. A. Morfología de los dientes descrita por Castillejo, 1968. B. Morfología de los dientes radulares descrito por Baker.

La morfología de dientes radulares fue muy diversa. Se identificó una fila de dientes centrales (figura 7a), reconocidos por ser los únicos que presentan una simetría. 20 hileras de dientes laterales a la izquierda y a la derecha (figura 7b y 7c), siendo muy rara la presencia de una hilera intermedia entre dientes laterales y los marginales, sólo del lado derecho (figura 7d). Y finalmente se extiende un aproximado de 25 hileras de dientes marginales hacia ambos lados de la rádula con distinta morfología entre ellos (figura 7e y 7f).

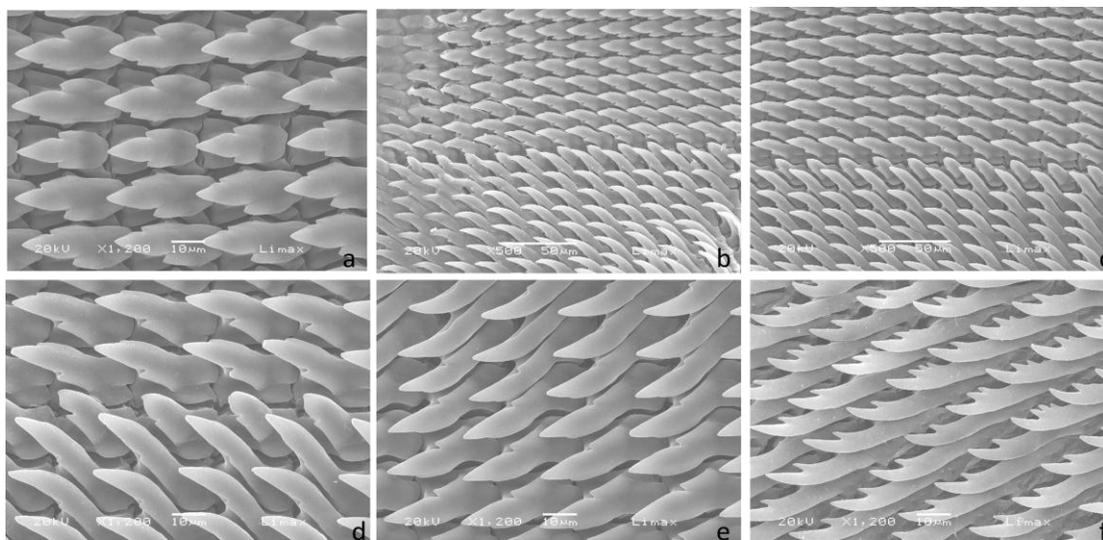


Figura 7. Fotografías de microscopía electrónica donde se observa la morfología de los dientes radulares. a: Hilera de dientes centrales y laterales, b: distinción entre dientes laterales y marginales del lado izquierdo de la rádula, c: distinción entre dientes laterales y marginales del lado derecho de la rádula, d: Distinción entre dientes laterales y marginales del lado derecho donde se observa una hilera intermedia de dientes de distinta morfología, e: Distinción entre dientes laterales del lado izquierdo, donde no se observa la hilera intermedia que vemos del lado derecho, f: variedades morfológicas de los dientes marginales.

Descripción del sujeto experimental

El objeto de estudio pertenece al phylum Molusca, clase gasterópoda y es miembro del orden Stylommatophora, y se ubica generalmente dentro de la familia Limacidae (Barker, 1999;). Esta especie se clasifica con el nombre de *Lehmannia valentiana*, el cual llega a variar de acuerdo al autor (Barker, 1999) y es ocnocida vulgarmente como babosa de Valencia (Barker, 1999).

Es originaria de la Península Ibérica, Europa y descrita por Férussac en 1823 (Pearse, 2004). Vulgarmente es conocida como babosa de jardín de tres bandas (Pearse, 2004).

Esta especie de babosa se caracteriza principalmente por tener una pseudoconcha, es decir, que no la pierde por completo. A simple vista no es posible distinguirla ya que se encuentra protegida por un manto (figura 8), el cual se extiende sobre la superficie de ésta, formando un escudo dorsal como protección de la misma (Barker, 1999).

Presenta el pneumostoma justo en la mitad posterior del lado derecho del manto y en éste se observan arrugas concéntricas similares a una huella dactilar, con manchas sobre la piel, similares a rayas y los adultos cuando están en movimiento tiene un tamaño de 5 a 7cm (Pearse *et al*, 2004)

Produce un moco incoloro y acuoso, producido en grandes cantidades cuando se les molesta (Pearse, 2004).

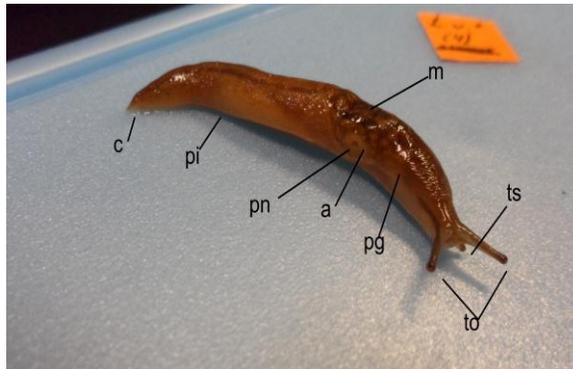


Figura 8. Morfología externa de *Lehmanna valentiana*. Donde **a**: ano; **c**: cola; **m**: manto; **pg**: poro genital; **pi**: pie; **pn**: pneumostoma; **to**: tentáculos ópticos; **ts**: tentáculo sensorial

La mandíbula se localiza en la región dorso-anterior de la cavidad bucal, y está fuertemente anclada en la pared de la masa bucal, lo que le permite al limácido mantener el alimento contra la rádula para facilitar su raspado.

Desarrollo embrionario

En base al interés del estudio embrionario de esta especie, se obtuvo el periodo del desarrollo embrionario, el cual se lleva a cabo alrededor de 20 a 21 días aproximadamente (figura 9), este tiempo puede variar de acuerdo a las condiciones de temperatura y humedad dentro de los terrarios.

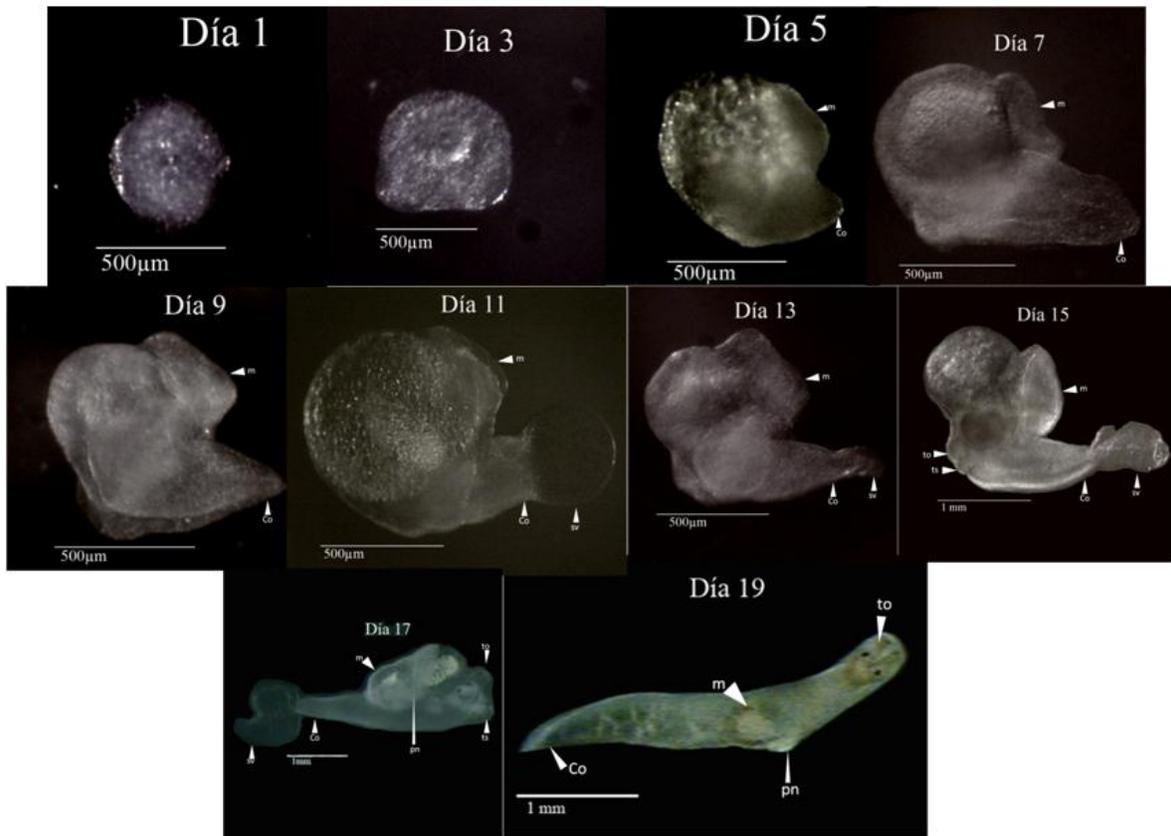


Figura 9. Caracterización de los estadios embrionarios de *Lehmannia valentiana*.

Se puede observar en el día 11 de desarrollo la presencia de un saco similar al que observamos en aves, reptiles y mamíferos, el cual suponemos cumple con la misma función de este en esos organismo ya que en el día 17 de desarrollo, se observa que quedará situado justo debajo del manto, a la altura del pneumostoma, por donde se efectúa el intercambio de gases del gasterópodo.

Conclusiones

- Se han establecido las condiciones idóneas para el mantenimiento y reproducción de la especie de gasterópodo terrestre *Lehmannia valentiana* dentro del laboratorio.
- Los datos proporcionados por las características morfológicas y radulares, comparadas con información previa, permitieron identificar a la especie de estudio.
- Los estudios preliminares alométricos demuestran que esta especie es un buen modelo para dar continuación a dichos estudios.

- Se requiere realizar otro tipo de técnicas histológicas como PAS y Tricrómico de Masson para identificar con mayor exactitud el tipo de tejido que se forma durante la cicatrización de la cola.
- Para confirmar la presencia de células de neoblasto durante la regeneración del tejido se propone realizar inmunoensayos con anticuerpos específicos para este tipo celular.

LITERATURA CITADA

- Barker, G. M. 1999. Naturalised terrestrial Stylommatophora (Mollusca: Gastropoda). *Fauna of New Zeland*. 38: 5-257.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Gen*. 77:71-94.
- Brusca, R. C. y G. J. Brusca. 2005b. Filo Moluscos (Mollusca). En: R. C. Brusca y G. J. Brusca (Ed.). *Invertebrados*. p 757. Mc Graw-Hill, Madrid.
- Brusca, R. C. y G. J. Brusca. 2005a. Desarrollo animal ciclos vitales y orígenes. En: R. C. Brusca y G. J. Brusca (ed.). *Invertebrados*. p 123. Mc Graw-Hill, Madrid.
- Castillejo, J. 1982. Los pulmonados desnudos de Galicia II. Género *Lehmannia* Heynemann, 1862. (Pulmonata: Limacidae). *IBERUS*. 2: 19-28
- Clemente, N. L., A. J. Faberi, A. N. López, P. L. Manetti, and H. A. Alvarez-Castillo. 2007. Biología de *Deroceras reticulatum* y *D. laeve*, moluscos de cultivos en siembra directa. *Rev. Inv. Agrop*. 36:129-142.
- Fretter, V. and A. Graham. 1994. *British Prosobranch Molluscs*. P 1-X. The Ray Society. Great Britain.
- Gilbert, F. S. 2006. Ciclos de vida y la evolución de los patrones de desarrollo. En: F. S. Gilbert (Ed.). *Biología del Desarrollo*. p 902. Médica Panamericana, Buenos aires.
- Goh, K. S., R. L. Gibson and d. R. Specker. 2003. Spotted Garden Slug. In: *Field crops*. IPM Publ. No. 102GFS795.30. p 1, New York State, EUA.
- Goldman, B., G. Eberhard, F. J. Karsch, D. Saunders, I. Zucker, G. F. Ball. 2004. Circannual Rhythms and Photoperiodism. En: Dunlap, J. C., J. J. Loros, P. J. DeCoursey. (Eds.). *Chronobiology: Biological Timekeeping*. p 108. Sinauer Associates, Sunderland.
- Henderson, I. and R. Triebkorn. 2002. Chemical control of terrestrial gastropods. In: G. M. Barker (Ed.). *Molluscs as crop Pests*. p 1. CABI Publishing, New York.
- Kingston N., 1966. Observations on the Laboratory Rearing of Terrestrial Molluscs. *American Midland Naturalist*. 76. 528-532.
- Langlois, T. H. 1965. The conjugal behavior of the introduced European giant garden slug, *Limax maximus* L., as observed on south bass island, lake Erie. *The Ohio Journal of Science*. 65. 298.
- Mc Donell, R. J., Paine, T. D. and Gormally, M. J. 2009. Slugs: A guide to the invasive and native fauna of California. University of California. 8336. pp 21.
- Moreno, S. J. R., Gaviria, G. B. M., Navarro, A. R., Durán, R. B., Vargas, D. Á., Aguirre, C. P. and Quiroz, V. C. E. 2008. Babosas en cultivo del Valle de San Nicolás

- (Cercano Oriente Antioqueño). Universidad Católica de Oriente. Río Negro, Colombia. pp 40.
- Pearce, T. A., Richart C. H., Leonard W. P. y Hohenloe P. A. 2004. Identification Guide to Land Snails and Slugs of Western Washington.
http://academic.evergreen.edu/projects/ants/TESCBiota/mollusc/key/webkey.htm#start_key
- Sánchez, A. A. 2003. The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*: embryogenesis, stems cells and regeneration. *Current opinion in genetics and Development*. 13:438-444.
- Thompson, R. and Cheney, S. 1996. Raising Snails. Special Reference Briefs Series no. SRB 96-05
- Udaka, H. and H. Numata. 2008. Short-day and low-temperature conditions promote reproductive maturation in the terrestrial slug, *Lehmannia valentiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 150:80-83.

APENDICE

Laboratory Rodent Diet

5001*

DESCRIPTION

Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is formulated using the unique and innovative concept of Constant Nutrition[®], paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 65 years.

Features and Benefits

- Constant Nutrition[®] formula helps minimize nutritional variability
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Formulated for multiple species for single product inventory
- The rodent diet standard for biomedical research

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

Other Versions Available

- S010 Laboratory Autoclavable Rodent Diet
- SLOD Ricolab Laboratory Rodent Diet (Nutrients table required)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	8.0%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, dried beet pulp, fish meal, ground oats, brewers dried yeast, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, dried whey, wheat germ, porcine animal fat preserved with BHA, porcine meat meal, wheat middlings, oak, calcium carbonate, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, vitamin A acetate, folic acid, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, thiamin mononitrate, nicotinic acid, calcium pantothenate, dl-alpha tocopheryl acetate, vitamin B₁₂ supplement, riboflavin, ferrous sulfate, manganese oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.
Rats: All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.
Mice: Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.
Hamsters: Adult will eat up to 14 grams per day.

CHEMICAL COMPOSITION¹

Nutrients²

Protein, %	23.9
Arginine, %	1.41
Cysteine, %	0.31
Glycine, %	1.21
Histidine, %	0.57
Isoleucine, %	1.14
Leucine, %	1.63
Lysine, %	1.41
Methionine, %	0.67
Phenylalanine, %	1.04
Tyrosine, %	0.71
Threonine, %	0.61
Tryptophan, %	0.29
Valine, %	1.17
Serine, %	1.19
Aspartic Acid, %	2.61
Glutamic Acid, %	4.37
Alanine, %	1.43
Proline, %	1.49
Taurine, %	0.02
Fat (ether extract), %	5.0
Fat (acid hydrolysis), %	5.7
Cholesterol, ppm	260
Linoleic Acid, %	1.22
Linolenic Acid, %	0.10
Arachidonic Acid, %	<0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	0.19
Total Saturated Fatty Acids, %	1.56
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.60
Fiber (Crude), %	5.1
Neutral Detergent Fiber ³ , %	15.6
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.7
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	48.7
Starch, %	31.9
Glucose, %	0.22
Fructose, %	0.30
Sucrose, %	3.70
Lactose, %	2.01
Total Digestible Nutrients, %	76.0
Gross Energy, kcal/gm	4.07
Physiological Fuel Value ⁵ , kcal/gm	3.36
Metabolizable Energy, kcal/gm	3.02

Minerals

Ash, %	7.0
Calcium, %	0.95
Phosphorus, %	0.66
Phosphorus (non-phytate), %	0.39
Potassium, %	1.18
Magnesium, %	0.21

Sulfur, %	0.36
Sodium, %	0.40
Chlorine, %	0.67
Fluorine, ppm	16
Iron, ppm	270
Zinc, ppm	79
Manganese, ppm	70
Copper, ppm	13
Cobalt, ppm	0.90
Iodine, ppm	1.0
Chromium, ppm	1.2
Selenium, ppm	0.30

Vitamins

Carotene, ppm	2.3
Vitamin K (as menadione), ppm	1.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Riboflavin, ppm	4.5
Niacin, ppm	120
Pantothenic Acid, ppm	24
Choline Chloride, ppm	2250
Folic Acid, ppm	7.1
Pyridoxine, ppm	6.0
Biotin, ppm	0.30
B ₆ , mg/kg	50
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.5
Vitamin E, IU/kg	42
Ascorbic Acid, mg/gm	—

Calories provided by:

Protein, %	28.507
Fat (ether extract), %	13.406
Carbohydrate, %	57.996

*Product Code

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrients lost will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.
3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.
4. ADF = approximately cellulose and lignin.
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.