

Desarrollo embrionario y larval temprano en *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) (Nudibranchia: Doridacea) en condiciones de laboratorio

Ramiro Contreras Guzmán¹ y Margarita Pérez Valdés²

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología, Universidad Arturo Prat, Puerto Montt, Chile. E-mail: ramiro.contreras@unap.cl

² Departamento de Acuicultura y recursos Acuáticos, Universidad de los Lagos, Osorno, Chile.
E-mail: macepe@gmail.com

Resumen

Las estrategias de desarrollo embrionario y larval del orden Nudibranchia son muy variadas, abarcando desarrollo planctotrófico, lecitotrófico y directo. Con el objetivo de describir el desarrollo embrionario y larval temprano de *Diaulula punctuolata*, una de las especies de nudibranchios más frecuentes en el Sur de Chile, se recolectó un grupo de 16 ejemplares adultos, de longitud entre 35,6 y 60,4 mm, los que fueron trasladados al laboratorio hasta la obtención de oviposturas. Estas fueron medidas y dejadas en acuarios a 10°C de temperatura y 30‰ de salinidad. Las oviposturas obtenidas presentaron forma de cinta en espiral, con una longitud que varió entre 110-510 mm. La fecundidad total promedio fue de 75.797 ± 51.939 embriones por ovipostura, distribuidos en cápsulas en un número que varió entre uno y tres. Además, se observaron cápsulas vacías ubicadas en ambos extremos de la cinta. Se registró un porcentaje, no cuantificado, de cápsulas con desarrollo asincrónico. *Diaulula punctuolata* presenta desarrollo indirecto con una fase intracapsular, eclosionando una larva véliger planctotrófica aproximadamente 20 días post ovipostura. Las larvas obtenidas en laboratorio sobrevivieron por un período de 19 días post eclosión, sin obtener metamorfosis.

Palabras claves: gasterópodo, nudibranchio, desarrollo embrionario, Chile.

Introducción

El nudibranchio *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) se distribuye desde el Callao Perú, hasta el extremo sur de Chile, alcanzando parte de la Patagonia Argentina (Schrödl, 1996; Valdés y Muniain, 2002). Es una de las especies de nudibranchios más frecuentes del Sur de Chile. Habita desde el intermareal rocoso hasta los 7 m de profundidad (Zagal y Hermosilla, 2001). Es un animal carnívoro y se alimenta principalmente de esponjas incrustantes (Zagal y Hermosilla, 2001).

Diaulula punctuolata presenta externamente un color que va desde el blanquecino al amarillento, su dorso está densamente cubierto por cariofilídeos delgados y pliegues en forma de collar elevados alrededor de los rinóforos. Posee de 6-7 racimos branquiales, tentáculos orales digitiformes, pie ancho surcado en dos

labios; labio superior con muesca vertical, alcanzando un largo total del manto de 10 cm (Schrödl, 1996).

Como la mayoría de los nudibranchios, *D. punctuolata* es hermafrodita simultáneo con fecundación cruzada interna (Todd y Doyle, 1981); sus puestas son cintas gelatinosas de color blanquecino, en forma de espiral que se adhieren a las rocas (Zagal y Hermosilla, 2001). En cuanto a las estrategias de desarrollo embrionario y larval de la subclase Opisthobranchia, a la que pertenece el orden de los nudibranchios, son muy variadas, abarcando el desarrollo planctotrófico, lecitotrófico y directo (Smith, 1967; Thompson, 1967; Bonar, 1978; Switzer-Dunlap y Hadfield, 1977; Gibson y Chia, 1989). Desde un punto de vista morfológico muchas especies de opisthobranchios presentan desarrollo

indirecto por lo que la metamorfosis ocurre en el ambiente, otros en cambio presentan desarrollo directo eclosionando un juvenil con un patrón de desarrollo metamórfico, es decir con estados larvales intracapsulares o un patrón ametamórfico sin estados larvales intracapsulares (Bonar, 1978).

El objetivo del presente trabajo es describir los estados de desarrollo embrionario y larval temprano del nudibranquio *Diaulula punctuolata* en condiciones de laboratorio y establecer su estrategia de desarrollo.

Materiales y métodos

Captura de ejemplares y obtención de oviposturas

Los ejemplares de *Diaulula punctuolata* (Fig. 1) fueron obtenidos mediante buceo apnea a una profundidad aproximada de 7 m en la localidad de Bahía Mansa (40°37'S; 71°48'W), ubicada a 65 km al Oeste de la ciudad de Osorno, Chile, en los meses de marzo a mayo de 2006 lo que determinó que se trabajara a 10°C, ya que corresponde a la temperatura promedio otoño-invierno para la zona.

Se recolectaron 16 ejemplares, de talla entre 35,6 y 60,4 mm de largo total del manto, los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Cultivos Marinos de la Universidad de los Lagos, Campus Osorno, donde se dispusieron parejas de individuos en ocho acuarios de 1 l a 10°C con agua de mar filtrada (1,0 µm), sin alimento y con aireación constante hasta obtener las oviposturas; posteriormente los adultos fueron retirados de los acuarios.

Desarrollo embrionario

Se midió el largo total y ancho de las oviposturas. Dado el enrollamiento que ellas presentaban, para medir el largo se utilizó un cordón que fue ubicado siguiendo la forma de la misma. Para estimar el ancho, así como los datos reproductivos: número de ovicápsulas, embriones por ovicápsula y fecundidad total, se trabajó con una muestra. Esta correspondió a un segmento obtenido de la zona media de cada ovipostura, el que fue observado en un microscopio invertido ZEISS AXIOVERT 25. Para determinar la fecundidad total, correspondiente al número de

embriones por ovipostura, se utilizó la siguiente ecuación:

$$F = \frac{C \times A_2}{A_1}$$

Donde:

F: Fecundidad total.

C: Total de embriones en la muestra.

A₁: Área de la muestra (mm²).

A₂: Área total de la ovipostura (mm²).

Los estados de desarrollo fueron seguidos hora a hora mediante la observación de la muestra en el mismo microscopio invertido equipado con una cámara fotográfica, desde el comienzo de la ovipostura hasta obtener el estado de mórula; posteriormente el monitoreo se realizó cada 24 horas.

Para la estimación de los tiempos de desarrollo se tomó como tiempo cero el comienzo de la ovipostura. El tiempo de desarrollo de cada estado ontogenético fue expresado en días post postura (DPP); para efectos descriptivos se referirá como período de desarrollo embrionario al tiempo desde el término de la ovipostura hasta el inicio de la eclosión.

Eclosión y desarrollo larval

El porcentaje de eclosión (E) se estimó mediante la ecuación:

$$E = \frac{L \times 100}{F}$$

Donde:

E: Porcentaje de eclosión.

L: Total de larvas eclosionadas.

F: Fecundidad total.

Una vez ocurrida la eclosión, las larvas fueron mantenidas en acuarios de 1 l a una densidad de 2 larvas/ml, 10°C de temperatura, 30‰ de salinidad, sin aireación, con agua de mar filtrada a 1 µm y alimentadas 1 vez al día con una dieta mixta compuesta por las microalgas *Isochrysis galbana* y *Dunaliella tertiolecta* en una proporción de 1:1 y a una concentración aproximada de 1.000 células/ml. La edad de las larvas fue expresada en días post eclosión (DPE).

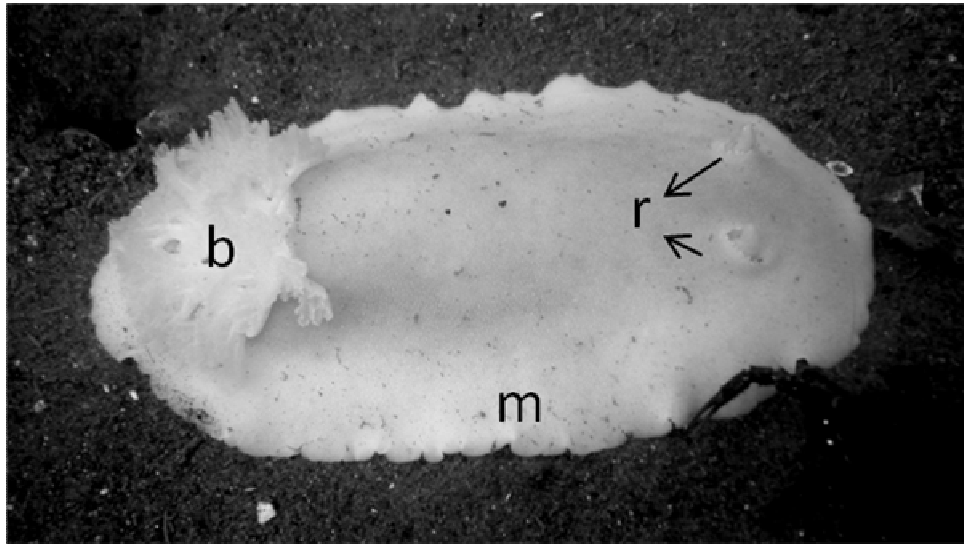


Figura 1. Ejemplar de *Diaulula punctuolata* en el medio natural. m: Manto, b: racimos branquiales y r: rinóforos.

Resultados

Obtención de oviposturas

El tiempo de pre-desove, considerado desde la llegada de los animales al laboratorio y el inicio de la puesta, fue variable con un rango entre una hora a una semana después de que los animales fueron ubicados en los acuarios. De cada pareja de nudibranquios se obtuvo una ovipostura, las que en

total fueron 6 (Tabla 1); el tiempo de desove varió entre 2 y 6 horas. Las oviposturas presentaron forma de cinta y fueron encontradas adheridas a las paredes laterales o fondo de los acuarios, formando una espiral de color blanco amarillento, constituidas por una matriz de consistencia gelatinosa en la cual se encontraban embebidas las ovicápsulas (Fig. 2).

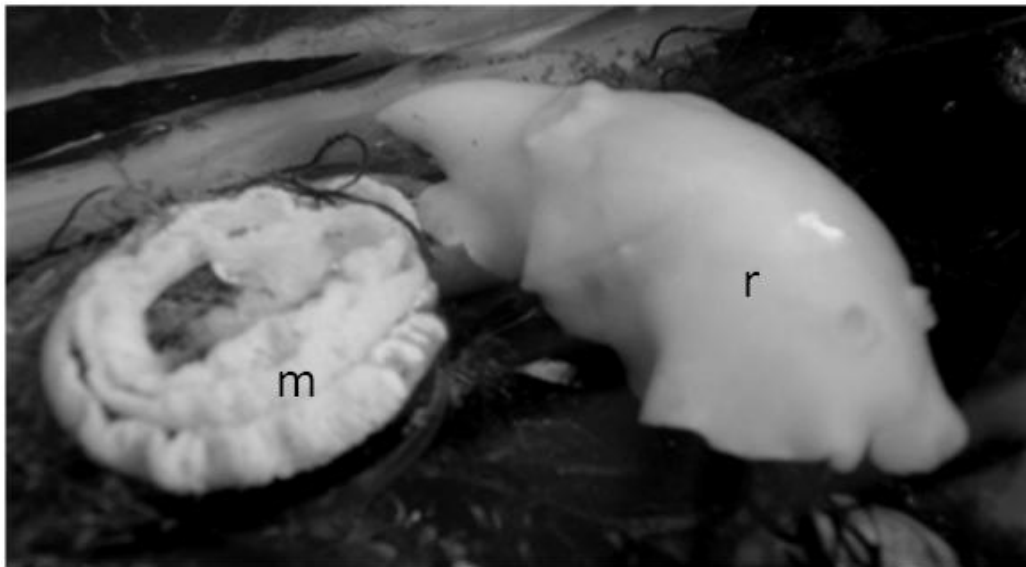


Figura 2. Obtención de puesta en condiciones de laboratorio. m: Masa de huevos depositada en forma de espiral y r: reproductor de *Diaulula punctuolata*.

El tamaño de las oviposturas fue variable, tanto en largo como en ancho, siendo la más corta de 110 mm y la más larga de 510 mm, en tanto que el ancho varió entre 3 y 6,5 mm por lo que el área total tuvo una variación entre 550 y 2.925 mm² (Tabla 1).

Las ovicápsulas presentaron forma ovalada y sus dimensiones variaron dependiendo del número de embriones con promedios de 145,6 ± 4,1 x 108,8 ± 6,9 µm; 228,0 ± 17,0 x 136,7 ± 4,7µm y 260 x 240 µm para 1, 2 y 3 embriones/ovicápsula, respectivamente. No se contabilizó el número de ovicápsulas por muestra.

En las oviposturas analizadas se presentaron de uno a tres embriones por cápsula (Fig. 3);

además en sus extremos se observaron cápsulas vacías que no fueron cuantificadas. La fecundidad total estimada bajo el supuesto que el número de cápsulas vacías no es significativo, varió entre 15.680 y 158.666 embriones/ovipostura, con un promedio de 75.797 ± 51.939 embriones/ovipostura, en tanto que la fecundidad relativa varió entre 363,0 y 3080,9 embriones/mm (Tabla 1).

El desarrollo intracapsular fue sincrónico; sin embargo, se registró un número no cuantificado de cápsulas con embriones en desarrollo asincrónico (Fig. 4).

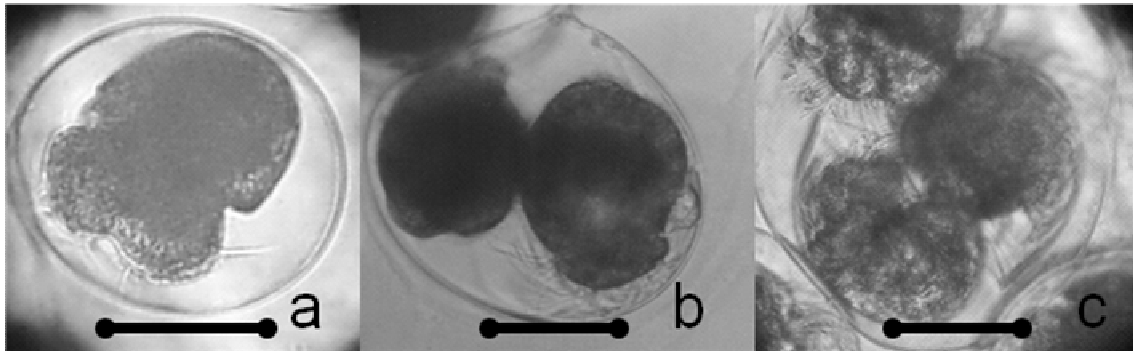


Figura 3. Cápsulas con diferente número de embriones en *Diaulula punctuolata*. a) cápsula con un embrión al estado de véliger temprana; b) cápsula con dos embriones al estado de trocófora; c) cápsula con tres embriones al estado de véliger. Barra de escala= 100 µm.

Tabla 1. Datos merísticos y reproductivos de las posturas del nudibranquio *Diaulula punctuolata*. Largo, ancho, área y número total de embriones por puestas (n=6). Promedio (+ DE).

Datos de las oviposturas						
Talla de los animales (mm)	Largo total (mm)	Ancho (mm)	Area (mm ²)	Fecundidad total	Fecundidad relativa (embriones/mm)	Eclosión (%)
35,6	139	4	556	54.968	1544,0	66,0
38,7	310	4	1.240	72.330	1869,0	26,8
43,2	110	5	550	15.680	363,0	79,7
43,3	200	5	1.000	25.296	584,2	86,5
51,5	510	5	2.550	158.666	3080,9	52,7
60,4	450	6,5	2.925	127.842	2116,6	82,5
Promedio	286,5 (151,4)	4,9 (0,8)	1.470,2 (934,4)	75.797 (51.939)	1592,9 (921,7)	65,7 (20,8)

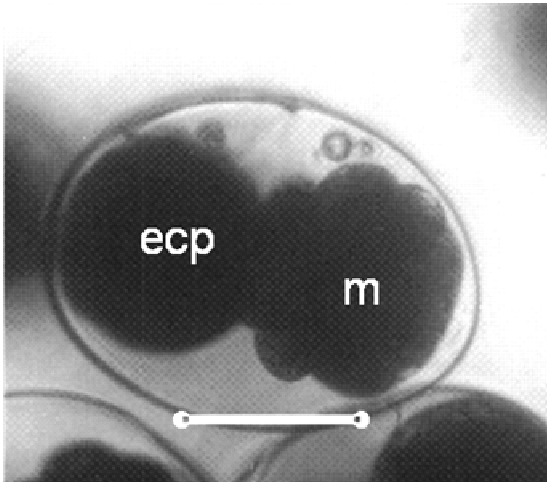


Figura 4. Desarrollo embrionario intracapsular asincrónico en *Diaulula punctuolata*; ecp, eliminación del corpúsculo polar; m, mórula. Barra de escala= 100 μ m.

Desarrollo embrionario

El estado de trocófora se alcanzó aproximadamente a los 9 DPP y su tamaño fue de aproximadamente 120 μ m. El estado de véliger temprana se logró a los 11 DPP y tubo una longitud máxima de 150 μ m. La eclosión de *D. punctuolata* se produjo en estado de larva véliger planctotrófica y se inició aproximadamente a los 20 DPP (Tabla 2), el tamaño de este estado de desarrollo fue de

200 μ m de longitud máxima con el velo extendido y 110 μ m de longitud de la protoconcha (Fig. 5g y 6). La larva véliger presentó velo bilobulado, distinguiéndose además la concha larval, el opérculo y los estatocistos (Fig. 6). El porcentaje de eclosión promedio fue $65,7 \pm 20,8\%$ aproximadamente, con una variación entre 26,8 y 86,5% (ver Tabla 1). Las sobrevivencia larval se logró hasta el día 19 posterior a la eclosión, los intentos de inducir metamorfosis mediante la exposición de las larvas a placas con biofilm de diatomeas (Zhao y Pei-Yuan, 2002; Wei-Yang *et al.*, 2007) no dieron resultados positivos.

Tabla 2. Tiempos de desarrollo embrionario post-postura en *Diaulula punctuolata* en condiciones de laboratorio.

Estado ontogenético	Tiempo
Eliminación corpúsculo polar	3,7 \pm 0,6 hrs
2ª División	12,5 \pm 0,7 hrs
Tétrada	21 hrs
Mórula	39 hrs
Trocófora	9 días
Véliger temprana	11 días
Véliger de eclosión	19 días

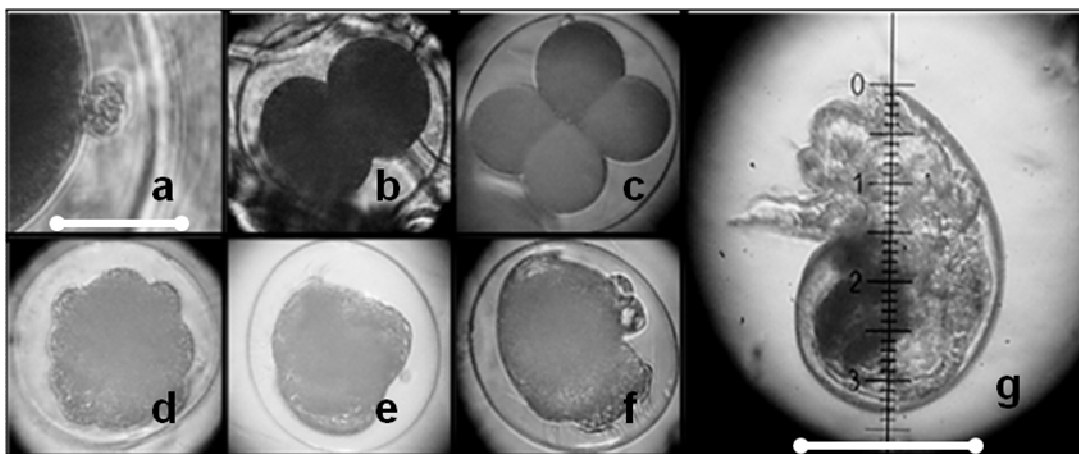


Figura 5. Estados de desarrollo temprano de *Diaulula punctuolata* bajo condiciones de laboratorio. a: eliminación del 1er corpúsculo polar; b) dos células; c) tétrada; d) mórula; e) trocófora ; f) véliger temprana; g) larva véliger planctotrófica. Barra de escala= 50 μ m (a) y 100 μ m (b, c, d, e, f, g).

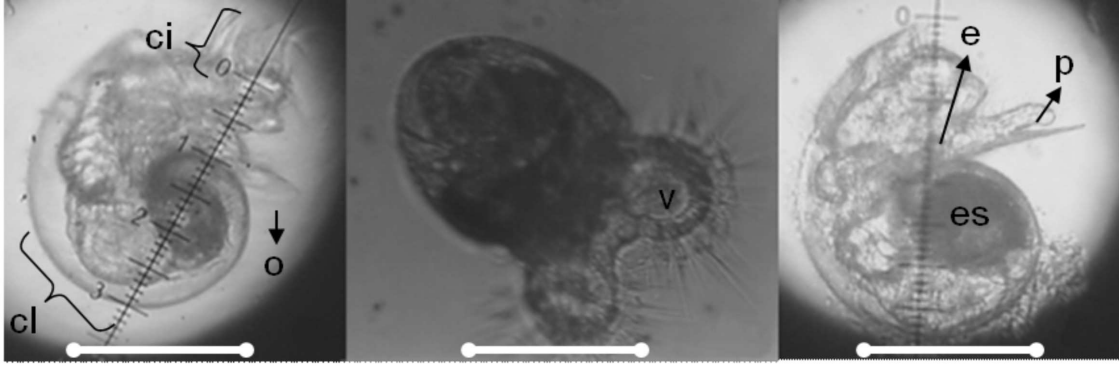


Figura 6. Tres vistas de la larva véliger planctotrófica de *Diaulula punctuolata*. Ci, cilios; cl, concha larval; o, opérculo; v, velo (bilobulada); e, estatocisto; p, pie; es, estómago. Barra de escala =100 µm.

Discusión

En el presente estudio se obtuvieron oviposturas viables de *Diaulula punctuolata* en condiciones de laboratorio, como ha sido descrito para otras especies de opistobranquios (Carroll y Kempf, 1990; Muniain *et al.*, 2001).

A diferencia de *Pleurobranchaea maculata* (Quoy y Gaimard, 1832) (Gibson, 2003), *Tylodina fungina* Gabb, 1865 (Collin, 2008) y *Doto uva* Marcus, 1955 (Fischer *et al.*, 2006), las oviposturas de *D. punctuolata* fueron obtenidas a partir de reproductores mantenidos sin alimento. Estos animales depositaron y adhirieron las oviposturas directamente en el acuario de vidrio de la misma forma que lo hacen otros opistobranquios en condiciones artificiales (Paige, 1988; Carrol y Kempf, 1990; Capo *et al.*, 2009).

Las ovicápsulas se encuentran encerradas en una matriz gelatinosa en forma de cinta en espiral, similar a lo descrito para *Berghia verrucicornis* (Costa, 1867) (Carroll y Kempf, 1990) y *Dendrodoris behrensi* Millen y Bertsch, 2005 (Goddard, 2005). Las ovicápsulas presentan un patrón variable respecto al número de embriones por cápsulas incluyendo la presencia de cápsulas vacías como en *B. verrucicornis* (Carroll y Kempf, 1990) y *Elysia patagonica* Muniain y Ortea, 1997 (Muniain *et al.*, 2001).

El desarrollo asincrónico observado en algunas cápsulas coincide con lo descrito para *B. verrucicornis* (Carroll y Kempf, 1990). De acuerdo a las observaciones realizadas en el presente trabajo, se propone que este patrón de desarrollo asincrónico ocurriría porque los espermatozoides quedarían atrapados en la membrana de gelatina que protege a los huevos y siguen activos después de algunas horas pudiendo fecundarlos en distintos

tiempos, por lo tanto la formación de los cigotos en el interior de algunas cápsulas ocurriría en tiempos diferentes.

Aun cuando el número de oviposturas obtenidas fue bajo ($n=6$), se observó una tendencia a incrementar el área de la misma y la fecundidad en relación a la talla de los animales (ver Tabla 1). La fecundidad total en *D. punctuolata* fue inferior a la descrita para ejemplares del nudibranquio *P. maculata* de talla 110 a 145 mm, 318.417 ± 110.602 embriones/ovipostura (Gibson, 2003); sin embargo al comparar la fecundidad relativa de ambas especies se obtienen valores similares en ejemplares sobre 51 mm (ver Tabla 1).

Los tiempos de desarrollo de *D. punctuolata* fueron más extensos, si se comparan con *T. fungina*, que eclosiona a los 13-15 días a 21- 24 °C (Collin, 2008), mientras que *D. punctuolata* mantenida a 10 °C eclosiona a los 20 días aproximadamente. Esta diferencia radica principalmente en la temperatura de mantención, ya que al aumentar la temperatura se acelera el metabolismo, lo cual modifica la energía disponible para crecimiento (González *et al.*, 2002)

La eclosión de *D. punctuolata*, al igual que en *Aplisya oculifera* Adams y Reeve, 1850 (Rudman, 2000) y *E. patagonica* (Muniain *et al.*, 2001), se produce al estado de larva véliger. Por lo tanto, se puede establecer que el patrón de desarrollo del nudibranquio *D. punctuolata* en las condiciones experimentales antes descritas, se ajusta al patrón de desarrollo indirecto con larva planctotrófica establecido por Bonar, (1978) y Brusca y Brusca (2002). Estos resultados coincidirían además con la estrategia descrita para los nudibranquios dóridos con desarrollo indirecto

que oviponen un gran número de huevos pequeños (Wilson, 1999), lo que permite que eclosionen una gran cantidad de larvas. Sin embargo, la tasa de mortalidad larval es relativamente alta, siendo pocos los individuos que alcanzan la metamorfosis y se transforman en adultos.

Agradecimientos

Se agradece al proyecto FONDEF DO3I1159, a Jadhuel Godoy quien se encargó de la fotografía submarina, al Dr. Erick Baqueiro por la revisión del manuscrito y a los dos correctores anónimos que hicieron importantes aportes para mejorar la calidad de la información entregada en el mismo.

Referencias bibliográficas

- Bonar, D. 1978. Morphogenesis at metamorphosis in opisthobranch mollusks. En: Chia, F. y M. Rice (eds.) Settlement and metamorphosis of marine invertebrates larvae. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York: pp. 177-196.
- Brusca, R. y G. Brusca. 2002. Invertebrates. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 936 pp.
- Capo, T., A. Bardales, P. Gillette, M. Lara, M. Schmale y J.E. Serafy. 2009. Larval growth, development, and survival of laboratory-reared *Aplysia californica*: Effects of diet and veliger density. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 149: 215-223.
- Carroll, D. y S. Kempf. 1990. Laboratory culture of the Aeolid Nudibranch *Berghia verrucicornis* (Mollusca, Opisthobranchia): Some aspects of its development and life history. Biological Bulletin 179: 243-253.
- Collin, R. 2008. Development of *Tylodina fungina* Gabb, 1865 (Gastropoda: Notaspidea) from the Pacific Coast of Panama. The Veliger 50(1): 51-56.
- Fischer, M. A., G. van der Velde y E. Roubos. 2006. Morphology, anatomy and histology of *Doto uva* Marcus, 1955 (Opisthobranchia: Nudibranchia) from Chilean coast. Contributions to Zoology 75 (3/4): 145-159.
- Gibson, G.D. 2003. Larval development and metamorphosis in Pleurobranchaea maculata, with a review of development in the Notaspidea (Opisthobranchia). Biological Bulletin 205: 121-132.
- Gibson, G.D. y S. Chia. 1989. Description of a new species of *Haminoea*, *Haminoea callidegenita* (Mollusca: Opisthobranchia), with a comparison with two other *Haminoea* species found in the northeast Pacific. Canadian Journal of Zoology 67(4): 914-922.
- Goddard, J. 2005. A metamorphic Direct development in *Dendrodoris behrensi* (Nudibranchia: Dendrodorididae), with a review of developmental mode in the family. Proceeding of the California Academy of Sciences 56(19): 201-211.
- González, M.L., D.A. López, M.C. Pérez y J.M. Castro. 2002. Effect of temperature on scope for growth in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture International 10: 339-348.
- Muniain, C., A. Marín y P.E. Penchaszadeh. 2001. Ultrastructure of the digestive gland of larval and adult stages of the sacoglossan *Elysia patagonica*. Marine Biology 139: 687-695.
- Paige, J. 1988. Biology, metamorphosis and postlarval development of *Bursatella leachii* plei Rang (Gastropoda: Opisthobranchia). Bulletin on Marine Science 42(1): 65-75.
- Rudman, W.B. 2000. *Aplysia oculifera* - Larval development and metamorphosis. (In) Sea Slug Forum. <http://www.seaslugforum.net/aplyocdev.htm>.
- Schhödl, M. 1996. Nudibranchia y Sacoglossa de Chile: Morfología exterior y distribución. Gayana Zoológica 60(1): 17-62.
- Smith, T. 1967. The development of *Retusa obtusa* (Montagu) (Gastropoda, Opisthobranchia). Canadian Journal Zoology 45(5): 737-764.
- Switzer-Dunlap, M. y M.G. Hadfield. 1977. Observation on development, larval growth and metamorphosis of four species of Aplysiidae (Gastropoda: Opisthobranchia) in laboratory culture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 29(3): 245-261.
- Thompson, T. 1967. Direct development in a nudibranch *Cadlina laevis*, with a discussion of developmental processes in Opisthobranchia. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 47(1): 1-22.
- Todd, C. y R. Doyle. 1981. Reproductive strategies of marine benthic invertebrates: A settlement-timing hypothesis. Marine Ecology Progress Series 4: 75-83.
- Valdés, A. y C. Muniain. 2002. Revision and taxonomic reassessment of Magellanic species assigned to *Anisodoris* Bergh, 1898

- (Nudibranchia: Doridoidea). Journal of Molluscan Studies 68: 345-351.
- Wei-Yang, B., C. Satuito, Y. Jin-Long y H. Kitamura. 2007. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. Marine Biology 150: 565-574.
- Wilson, N. 1999. Nudibranch egg size. En: Australasian nudibranch News. No.11, July 1999, 4 pp.
- Zagal, C. y C. Hermosilla. 2001. Guía de invertebrados marinos del litoral valdiviano. Quebecor World Chile S.A. 217 pp.
- Zhao, B. y Q. Pei-Yuan. 2002. Larval settlement and metamorphosis in the slipper limpet *Crepidula onyx* (Sowerby) in response to conspecific cues and the cues from biofilm. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 269(1): 39-51.