

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO PARA *Aplysia*
spp Y DESCRIPCIÓN PARCIAL DEL DESARROLLO LARVARIO DE
Aplysia vaccaria”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N Ó L O G O
PRESENTA:
CAROLINA NAVARRO REYES

ENSENADA, B. C. Junio 2007

RESUMEN

El género *Aplysia*, que en Baja California incluye como especies más comunes a *Aplysia californica* y *Aplysia vaccaria*, se caracteriza por un rápido crecimiento y *A. vaccaria* es reconocida como uno de los gasterópodos más grandes del mundo. Debido a estas características, a su relación filogenética cercana y a que presentan velocidades de crecimiento contrastantes con organismos del género *Haliotis*, resultan en un modelo interesante para comparar los mecanismos que regulan su crecimiento.

Actualmente, el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del I.I.O. de la UABC ha iniciado investigaciones para caracterizar estos mecanismos. Por tal motivo, se necesita implementar un sistema de cultivo para *Aplysia* para tener constantemente organismos en el laboratorio; y además se requiere realizar una descripción del desarrollo larvario de *A. vaccaria*, ya que éste no ha sido descrito.

Para implementar el sistema de cultivo, se pusieron a prueba dos tipos de sistemas de cultivo: un sistema abierto y un sistema cerrado. El sistema abierto es una adaptación de sistemas implementados anteriormente en el laboratorio; mientras que el sistema cerrado se basó en los sistemas utilizados en estudios anteriores para cultivo de la especie. El sistema abierto se utilizó con larva de *A. vaccaria*. Se observa que para futuros experimentos es necesario hacer una modificación en lo referente al filtrado del agua mediante la utilización de filtros de 5 y 1 μm y lámparas de UV. Por otra parte, la utilización de 1-hexadecanol molido incrementa la supervivencia de las larvas, ya que disminuye la tensión superficial en la cual quedan atrapadas las larvas veliger recién eclosionadas.

El sistema cerrado se utilizó con larva de *A. californica* y con larva de *A. vaccaria*. Para este sistema se recomienda utilizar densidades bajas de larva y de preferencia utilizar filtros de 0.22 y 0.45 micras y agua de mar irradiada con UV.

Se observó que los adultos de *A. vaccaria* aumentan rápidamente de peso. Se recomienda utilizar puestas que se obtengan en los meses de primavera, ya que la calidad de los embriones es mejor, y las temperaturas de 17 a 23 °C, son adecuadas para un buen desarrollo tanto de embriones como de las larvas.

El desarrollo larval es descrito parcialmente para *A. vaccaria* y corresponde, en estas fases iniciales al desarrollo característico de los Aplysidos.

“IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO PARA *Aplysia*
spp Y DESCRIPCIÓN PARCIAL DEL DESARROLLO LARVARIO DE
Aplysia vaccaria”

T E S I S
QUE PRESENTA:

CAROLINA NAVARRO REYES

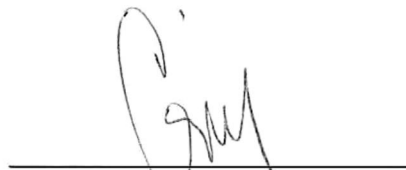
Aprobada por:



Presidente del Jurado
Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte



Sinodal Propietario
M.C. Roberto Escobar Fernández



Sinodal Propietario
M.C. Griselda M. Parés Sierra

**Para S. P. B. ,
por todo el tiempo transcurrido**

DEDICATORIA

Ramón y Carolina, mis padres
Tetay, Pepe y Mamá Lolo, mis abuelitos y tía
Ramón y Almendra, mis hermanitos

Para la familia.

Por ser la base de lo que soy como persona.

Este trabajo que es el punto final de mi licenciatura, es una forma de decir que tan agradecida estoy por todo el apoyo que me han dado, por toda la libertad que he tenido para realizar mis ideas, pero sobre todo, por todo el amor y los buenos momentos que siempre tuve.

También es para mi abuelita Licha y mi abuelito Pancho, que se nos adelantaron en este viaje.

AGRADECIMIENTOS

A *mi familia*, por el amor y apoyo que me han dado. “Porque no me basta con estar pobre, sino también loca”.

Para todas aquellas personas que he encontrado a lo largo de este camino, gracias por escuchar, regañar, comprender, alegrar, dar ideas, por prestar su hombro para llorar, por aparecer desde los 10 años y soportarme todos este tiempo, por los e-mails contando sus nuevas vidas, por los reencuentros en Acapulco todos los veranos e inviernos, por compartir desvelos, trabajos, salidas de campo, casas de campaña, cafés, comidas, caminatas diurnas y nocturnas, películas, libros, llamadas, chistes, noches y días, laboratorios, música, juegos de rol, fiestas, conciertos, bailes, meditaciones, problemas existenciales, casas y cosas, en fin... por ser la banda y estar en las buenas y en las no tan buenas... son la onda!

Lucero, Lucy, Lupis, Anahí, Andrés, Faby, Chuy, Criss, Gaby Mayorga, Luis Malpica, Roger, Pancho, Livia, Daniel, Denise, Alejandra, Lupita, Nelva, Pantera, Tihui, China, Adry, Rut, Moni, Karina y Lupita Lugo, Juanjo, Maribel, Pucho, Siadi, Humberto, Néstor, Raquel, Gerardo, Varinka, Polo, Paola, Juan Carlos, Felipe, Alberto, Saúl, Manuel, Liz, Rocío, Isamara, Claudia, Anais, Marichú, Adriana Ballesteros.

Al comité de titulación: director de tesis *Dr. Eugenio Carpizo*, y a mis sinodales *M.C. Roberto Escobar* y *M.C. Griselda Parés*, por todo el apoyo para este trabajo.

A los profesores que siempre me han dado ánimos en todo lo que hago: *Franco, Inés* y *Noelia Liquidano*, en preparatoria; y en universidad *Dora Waumann, Chelo Valle, Alfredo Salas, Guillermo Ballesteros, Alberto Gálvez, Roberto Millán, Sergio Pou, Memo Ávila, Roberto Enríquez, Rubén Castro, Paty Alvarado, Elizeo* y *José Antonio Almanza (los Cheos), Guille Chee, Isai Pacheco, Yoli Schramm, Antonio Segovia, Víctor Zavala, Gabo Correa, Víctor Macías.*

A la *Facultad de Ciencias Marinas*, porque siempre serán como mi segunda casa ...
“Yo si le voy, le voy a Marinas”

A la UNDL: *Brenda Bañaga, Lulú* y *Adriana Ballesteros, Luis Siero, Rafael Padilla* por todo el apoyo, Gracias.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	II
HOJA DE APROBACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.....	3
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
1. Organismos.....	8
1.1. Colecta y mantenimiento de los organismos.....	8
1.2. Mantenimiento de las puestas.....	11
2. Sistemas de cultivo.....	12
2.1. Sistema abierto (<i>A. vaccaria</i>).....	12
2.2. Sistema cerrado (<i>A. californica</i>).....	15
2.3. Sistema cerrado (<i>A. vaccaria</i>).....	16
3. Desarrollo larvario de <i>A. vaccaria</i>	18

RESULTADOS.....	19
1. Sistemas.....	19
1.1. Sistema abierto (<i>A. vaccaria</i>).....	19
1.2. Sistema cerrado (<i>A. californica</i>).....	21
1.3. Sistema cerrado (<i>A. vaccaria</i>).....	25
2. Desarrollo larvario.....	29
2.1. Reproductores y puestas.....	29
2.2. Desarrollo larvario.....	34
DISCUSIÓN.....	41
1. Sistema de cultivo.....	41
1.1. Sistema abierto (<i>A. vaccaria</i>).....	41
1.2. Sistema cerrado (<i>A. californica</i> y <i>A. vaccaria</i>).....	42
2. Desarrollo larvario.....	45
2.1 Reproductores y puestas.....	45
2.2 Desarrollo larvario.....	47
CONCLUSIONES.....	48
1. Sistemas.....	48
2. Desarrollo larvario.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización de las áreas donde fueron colectadas <i>Aplysia vaccaria</i> y <i>A. californica</i>	9
Figura 2. Estanques donde se mantuvieron adultos de <i>A. vaccaria</i> y <i>A. californica</i> durante los primeros meses del año.....	10
Figura 3. Camas donde se mantuvieron adultos de <i>A. vaccaria</i> y <i>A. californica</i> durante los meses de julio, agosto y septiembre.....	10
Figura 4. Frascos con puesta de <i>Aplysia vaccaria</i> , etiquetados y con piedra difusora. Se aprecia la coloración rosada de las puestas.....	11
Figura 5. Esquema del sistema abierto para cultivo larvario de <i>A. vaccaria</i>	13
Figura 6. Sistema de cultivo abierto donde se aprecian las hojuelas de 1-hexadecanol (puntos blancos) esparcidas en la superficie.....	14
Figura 7. Sistema de alimentación utilizado para el sistema abierto.....	14
Figura 8. Esquema del sistema cerrado para <i>A. californica</i> y <i>A. vaccaria</i> . Cada uno de los rectángulos representa los recipientes del sistema.....	17
Figura 9. Temperatura (°C) registrada a lo largo del experimento de sistema abierto para <i>Aplysia vaccaria</i>	19
Figura 10. Crecimiento observado después de una semana de cultivo en los sistemas abiertos C1-C2 para <i>A. vaccaria</i>	20
Figura 11. Temperatura (°C) registrada a lo largo del experimento de sistema cerrado para <i>Aplysia californica</i>	22
Figura 12. Crecimiento semanal en los 3 tratamientos utilizados en el sistema cerrado para <i>A. californica</i>	23

Figura 13. Porcentajes de mortalidad, en los 21 días de cultivo, para los diferentes tratamientos utilizados en sistema cerrado para <i>A. californica</i>	24
Figura 14. Temperatura (°C) registrada a lo largo del experimento de sistema cerrado para <i>Aplysia vaccaria</i>	26
Figura 15. Crecimiento semanal en los 3 tratamientos utilizados en el sistema cerrado para <i>A. vaccaria</i>	27
Figura 16. Porcentajes de mortalidad, en los 16 días de cultivo, para los diferentes tratamientos utilizados en sistema cerrado para <i>A. vaccaria</i>	28
Figura 17. Adulto de <i>Aplysia vaccaria</i>	31
Figura 18. Puesta de <i>A. vaccaria</i>	31
Figura 19. Pesos por mes de las puestas de <i>A. vaccaria</i> recolectadas a lo largo del experimento.....	32
Figura 20. Temperatura (°C) del agua en el que están las puestas de <i>A. vaccaria</i> registrada en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC.....	32
Figura 21. Temperatura (°C) del agua en el que están las puestas de <i>A. vaccaria</i> registrada en el Laboratorio de Bioensayos II (Junio/Julio).....	33
Figura 22. Temperatura (°C) del agua en el que están las puestas de <i>A. vaccaria</i> registrada en el Laboratorio de Bioensayos II (Septiembre/Octubre).....	33
Figura 23. Puesta de <i>A. vaccaria</i> en donde se observan los embriones al inicio de su desarrollo, contenidos en sus cápsulas (Objetivo 10x).....	35
Figura 24. División en espiral de <i>A. vaccaria</i> a las 24 hrs (Objetivo 20x).....	36
Figura 25. Continuación de la división en espiral de <i>A. vaccaria</i> a las 48 hrs (Objetivo 20x).....	36

Figura 26. Continuación de la división en espiral de <i>A. vaccaria</i> a las 72 hrs (Objetivo 20x).....	37
Figura 27. Continuación de la división en espiral de <i>A. vaccaria</i> a los 5 días (Objetivo 20x).....	37
Figura 28. Primeros movimientos de los embriones de <i>A. vaccaria</i> a los 9 días (Objetivo 20x).....	38
Figura 29. Larva trocófora de <i>A. vaccaria</i> a los 10 días (Objetivo 20x).....	38
Figura 30. Desarrollo de larva véliger de <i>A. vaccaria</i> a los 12 días (Objetivo 20x).....	39
Figura 31. Desarrollo de larva véliger de <i>A. vaccaria</i> a los 13 días (Objetivo 20x).....	39
Figura 32. Desarrollo de larva véliger de <i>A. vaccaria</i> a los 15 días (Objetivo 10x).....	40
Figura 33. Larva véliger eclosionada de <i>A. vaccaria</i> a los 17 días (Objetivo 20x).....	40

INTRODUCCIÓN

La subclase Opisthobranchia pertenece a la clase Gasterópoda dentro del phylum de los Moluscos. En todo el mundo, se presentan más de 3000 especies descritas, este grupo de moluscos es extremadamente diverso (Behrens, 1991). Se reconocen nueve o más ordenes de opisthobranchios, pero se suelen subdividir en dos grupos: tectibranchios, generalmente con branquia y concha, y nudibranchios, no hay concha ni verdadera branquia, pero si branquias secundarias a lo largo del dorso o alrededor del ano. Los nudibranchios están representados por las babosas marinas, mientras que entre los tectibranchios están las *Aplysias*, y las mariposas marinas (Hickman, 1998). Por lo común, poseen dos pares de tentáculos, en los cuáles, el segundo par esta modificado (rinóforos), con pliegues laminares que aparentemente aumentan la superficie quimiorreceptora. La concha esta reducida o falta (Hickman, 1998). Su morfología externa consta de una cabeza, pie e internamente una masa visceral.

El género *Aplysia*, pertenece al orden aplysiomorfa de la familia Aplysiidae, comúnmente conocidos como liebres marinas. Habitan ambientes marinos poco profundos alrededor del mundo. Son animales herbívoros y el tamaño de los adultos varia según la especie (Switzer-Dunlap & Hadfield, 1981). Las especies comunes en Baja California son *Aplysia californica* y *A. vaccaria*. La primera de ellas ha sido ampliamente utilizada en estudios de neurobiología, como los realizados por Eric Kandel y sus colaboradores de la Universidad de Columbia, E.U., para explicar los mecanismos del proceso del aprendizaje (Curtis & Barnes, 2000). Por su parte *Aplysia*

vaccaria, con un cuerpo similar al de *A. californica*, se caracteriza por tener un cuerpo firme, en donde la parapodia (pliegue localizado en la parte dorsal encerrando la cavidad del manto), se une justo por detrás del sifón exhalante. Esta especie tiene un color que va de café oscuro a negro, algunas veces con finas marcas grises o blancas. Esta especie no produce la tinta púrpura cuando es molestada como es el caso de *A. californica*. Se conoce como uno de los gasterópodos más grandes del mundo, con longitudes de hasta 99 cm y un peso de hasta 14 kg (Behrens, 1991), su alimento específico es el alga café *Egregia* spp (Winkler & Dawson, 1963). Farmer (1967) la reporta desde San Pedro, California hasta Cabo Colonett, Baja California; también se tienen reportes de organismos en el Golfo de California, en la zona de Bahía de Los Ángeles (Beeman & Williams, 1980). Es reportada como un organismo de hábitos nocturnos por Eales (1960); habita costas rocosas y camas de algas, algunas veces se puede localizar en bahías y estuarios (Behrens, 1991); la época de desove comprende de Febrero a Marzo en aguas poco profundas (Winkler 1954).

La importancia en el estudio de los opisthobranchios del género *Aplysia* se centra en que son utilizados como modelo en una gran variedad de disciplinas biomédicas; incluyendo neurobiología, estudios de comportamiento, control hormonal y reproducción y en biología del desarrollo (Switzer-Dunlap & Hadfield, 1981).

Behrens (1991) indica que *Aplysia* es invaluable en la investigación médica por tener cuerpos suaves y grandes así como un movimiento lento; son ideales para los estudios fisiológicos relacionados con el funcionamiento del sistema nervioso, ya que poseen un sistema nervioso simple en comparación con el de los vertebrados lo cual facilita la identificación de neuronas individualmente (Curtis & Barnes, 2000). Algunos

producen sustancias químicas, las cuales pueden usar como mecanismo de defensa, tal es el caso de la tinta púrpura de *A. californica*; otros son usados para buscar sustancias con propiedades antibióticas y anticancerígenas.

Recientemente, se han iniciado estudios en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, con el objetivo de caracterizar los mecanismos que regulan el crecimiento en moluscos gasterópodos. Los estudios se centran en dos géneros de la región que son *Haliotis* y *Aplysia*, ya que pertenecen a la misma subclase de moluscos y presentan patrones de crecimiento similares. La diferencia se da en que el desarrollo larval de *Aplysia* es más largo que el de *Haliotis*, pero en poco tiempo *Aplysia* tiene organismos aptos para reproducirse, en comparación con *Haliotis*. Debido a lo anterior, la necesidad de contar con una metodología de cultivo para *Aplysia* resulta de suma importancia, ya que se requieren constantemente organismos para los experimentos de crecimiento. Además, el desarrollo larvario de *A. vaccaria*, una especie abundante en la región, no ha sido descrito hasta el momento.

Antecedentes

Desarrollo larvario de la especie

Aplysia sp. es un herbívoro hermafrodita que deposita masas de huevos, también llamadas “puestas”, que coloca en las algas o en las rocas localizadas en la zona intermareal o submareal somero. El desarrollo embrionario ocurre dentro de estas masas, que son masas gelatinosas llenas de cápsulas con huevos fertilizados internamente (Switzer-Dunlap y Hadfield, 1981).

El movimiento de los embriones dentro de las cápsulas se puede ver a los 4 o 5 días después de que los huevos fueron puestos y la eclosión ocurre 5 o 6 días después de que se observa el movimiento (Kriegstein *et al.*, 1974).

Kriegstein (1977) divide el ciclo de vida de *Aplysia* en cinco fases: 1) **La Embriónica**, que tiene una duración de diez días, a 22° C. Esta etapa comprende desde la fertilización de los huevos hasta la eclosión de la larva véliger; 2) **La Planctónica**, que dura aproximadamente 34 días y durante los cuales la larva véliger pelágica se alimenta de fitoplancton. Durante esta fase el diámetro máximo de la concha de la larva véliger incrementa de un promedio de 135 μm a 400 μm . Los cambios externos incluyen un crecimiento del velo, cambios en la concha y desarrollo de los ojos y del propodio (Kriegstein *et al.*, 1974). 3) **La Metamórfica**, que tiene una duración de dos a tres días, durante los cuales la larva se transforma en juvenil bentónico y se alimenta de algas. 4) **La Juvenil**, que dura aproximadamente 90 días, en los cuales la postlarva se prepara para madurar y pasar a la fase final que es la de **Adulto**, y que constituye la quinta fase del ciclo de vida.

Kriegstein (1977) además, divide en 13 “estados” la fase planctónica, metamórfica y juvenil, con el fin de lograr una clasificación más detallada del desarrollo.

Cultivo de la especie

Los opistobranquios son organismos que se cultivan para modelos de investigaciones neurobiológicas principalmente, y para explicar el desarrollo y aspectos de la subclase. Carroll y Kempf (1990) cultivaron al nudibranquio *Berghia verrucicornis*, para estudios de desarrollo embrionario, larval y metamorfosis. Para lo

anterior utilizaron agua de mar artificial filtrada a 0.45 μm . Prepararon contenedores con el agua de mar artificial y la anémona *Aiptasia pallida*, que fue utilizada como alimento, se hicieron recambios diarios de agua. Cuando la larva eclosionó, fue concentrada con un filtro Nitex y agregada a los contenedores, la densidad de la larva dependió de los experimentos. No se usaron antibióticos en el sistema, ni para el cultivo de los diferentes estadios de desarrollo, los recambios de agua fueron suficientes para prevenir problemas con la contaminación por protozoarios o bacterias.

Kriegstein et al. (1974) cultivaron *A. californica* en sistemas semicerrado, en recipientes de 4 litros con agua de mar filtrada y densidades de larva de 100 larvas/litro. Los recambios de agua fueron cada 2 días y el alimento que se proporcionó fue la microalga *Isocrysis galbana*, la cual fue administrada al cultivo en concentraciones de 10,000 células por mililitro. Los recipientes fueron tapados con plástico para evitar evaporación y basura en el recipiente. Cuando la larva estuvo lista para la metamorfosis fue cambiada a pequeñas cajas con agua de mar filtrada, en grupos de 10 larvas, en los cuales se agregó el sustrato para inducir las a la metamorfosis.

Switzer-Dunlap y Hadfield (1981), ofrecen uno de los métodos más completos, ya que incluyen los cuidados que se deben de seguir para mantener a las larvas y los adultos. Estos autores utilizaron agua de mar filtrada y recomiendan usar contenedores de 600 y 1000 ml, los cuales pueden ser tapados con plástico para evitar la entrada de basura. Las densidades utilizadas fueron variables, siendo las de 0.5 y 1 larva por mililitro las más recomendables, aunque se han cultivado otras especies, como *A. brasiliensis* a densidades de 0.167 a 0.5 larvas/ml (Strenth & Blankenship, 1978). Estos autores mencionan el uso de antibióticos para disminuir la mortalidad, utilizando 0.6g de

Penicilina G, y 0.5g de Sulfato de Estreptomicina disueltos en 100 ml de agua, y administrados en 1 ml por cada 100 ml del cultivo.

Para prevenir que las larvas queden atrapadas en la interfase agua-aire, recomiendan el uso de hojuelas de 1-hexadecanol esparcidas por la superficie. El alimento recomendado son las microalgas *Pavlova lutheri* y/o *Isocrysis galbana*, las cuales son administradas en densidades de 10,000 células/ml. Cuando las larvas estuvieron listas para la metamorfosis, en grupos de 20 larvas, fueron colocadas en cajas Petri con agua de mar filtrada, con un poco de 1-hexadecanol y el alga que serviría de sustrato.

En el laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, se han llevado a cabo varios experimentos para mantener larvas de *A. vaccaria*. Se tienen los experimentos en los cuales se utilizaron recipientes de 5 litros con densidades de larvas de 6-8 por ml (com. per. Alin Aguilar y Jimena Malagamba*). Las larvas fueron alimentadas con *Isochrysis galbana* y *Tretraselmis sp* (50/50) y se utilizaron 20 ml de alimento por cada litro de cultivo. Las larvas se alimentaron diariamente a partir de los cambios de agua. Se utilizó plástico adherido al recipiente, para evitar la tensión superficial y que las larvas quedaran atrapadas en la superficie. Con esta metodología no se alcanzó a completar el desarrollo larval de *A. vaccaria*; en la misma forma, en experimentos en donde se utilizó un sistema abierto y una alimentación por medio de venoset, no fue posible completar el desarrollo larvario (com pers Roger Frías *¹).

* Egresadas de la Facultad de Ciencias Marinas, UABC

*¹ Egresado de la Facultad de Ciencias Marinas, UABC

Hipótesis

- 1.- De acuerdo con la experiencia que se tiene en el cultivo de aplysidos, densidades larvales de cultivo menores o iguales a 1 larva/ml y un control sobre los parámetros de temperatura, limpieza y tensión superficial en el sistema, serán suficientes para obtener buena sobrevivencia de las larvas hasta alcanzar el estadio de competencia.
- 2.- Por las características de su puesta, el desarrollo larval de *Aplysia vaccaria* deberá ser similar al desarrollo larvario característico de los aplysidos y descrito para otras especies como *A. californica* y *A. brasiliana*.

Objetivos

- 1.- Desarrollar un sistema de cultivo para *Aplysia* spp. que permita mantener desde la depositación de la masa de huevos hasta el estadio de larva competente.
- 2.- Describir el desarrollo embrionario y larvario de *Aplysia vaccaria*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Organismos

1.1. Colecta y mantenimiento de los organismos

Adultos de *Aplysia vaccaria* y *A. californica* fueron colectados durante la marea baja, en los meses de marzo, abril, mayo, junio y septiembre para *A. vaccaria*, y en febrero, julio y agosto para *A. californica*. Los lugares donde se recolectaron los organismos fueron en Punta Morro y cerca de la Pesquera Zapata, ambos localizados en la Bahía de Todos Santos, Baja California (Cruz-Colin, 1994); entre los 31°40' y 31°55' de latitud Norte y los 116° 36' y 116°50' de longitud Oeste (Fig.1). Los organismos fueron pesados y separados por especie y se mantuvieron en el invernadero del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), en estanques de 400 litros con agua de mar y aireación en un sistema de flujo abierto a temperatura ambiente (20-24 °C, ver Fig. 2). Durante este periodo se alimentaron con *Egregia* sp. y *Macrosystis pyrifera*. Diariamente se realizó la limpieza de los estanques. Los organismos se mantuvieron en estos estanques hasta el mes de junio. Para los meses siguientes (julio, agosto y septiembre), los organismos que se recolectaban se colocaron en el Laboratorio de Bioensayos II, de Acuicultura del IIO. El laboratorio está a temperaturas bajas (13-18°C). Son camas de 20 cm de alto con capacidad de 200 litros, con aireación y sistema de agua de mar con flujo abierto (Fig. 3). El alimento suministrado fue el mismo que el dado en los estanques y la limpieza se realizó diariamente.

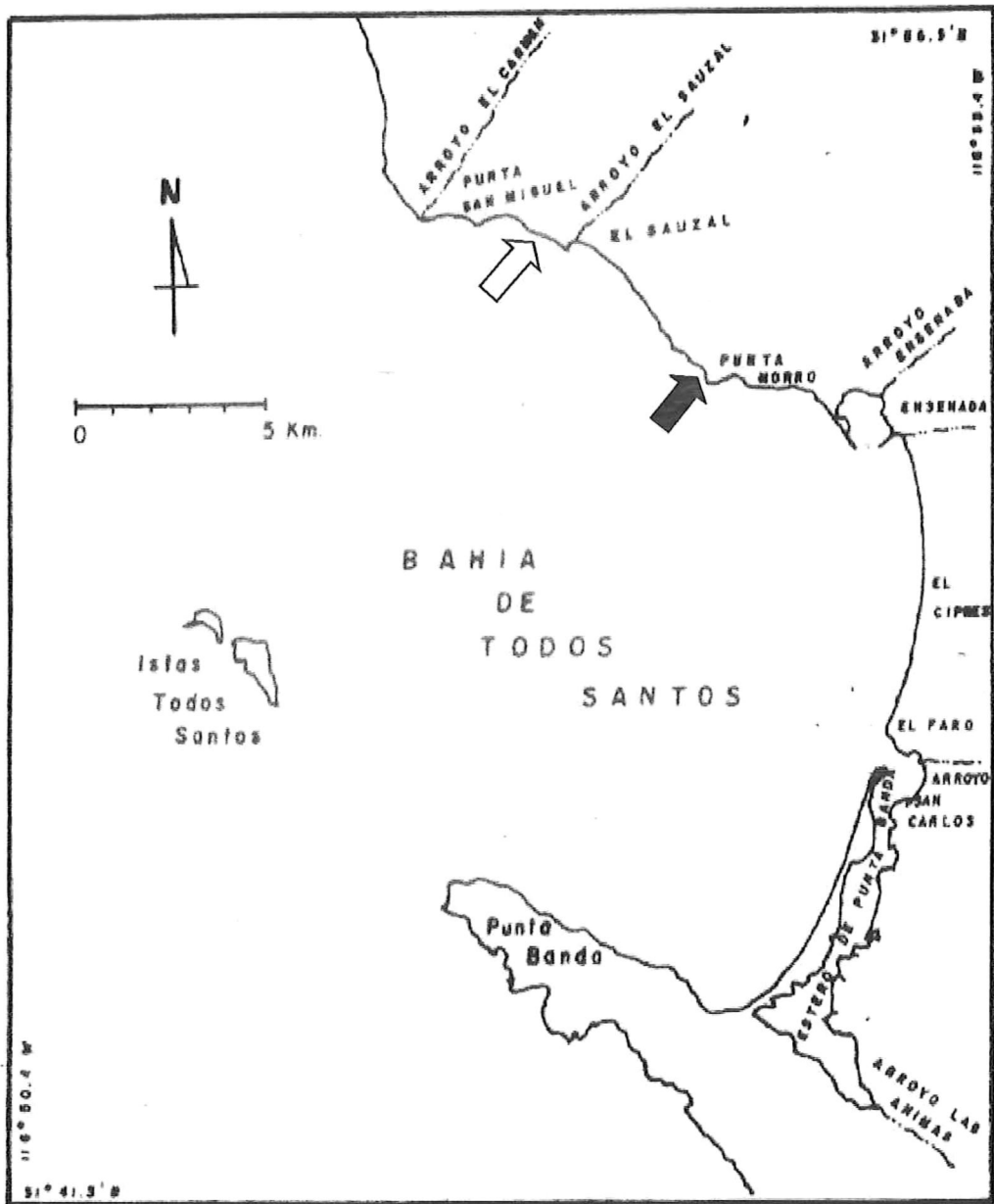


Figura 1. Localización de las áreas donde fueron colectadas *Aplysia vaccaria* y *A. californica*. La flecha negra (➡) indica Punta Morro y la flecha blanca (⇨) Pesquera Zapata.



Figura 2. Estanques donde se mantuvieron adultos de *A. vaccaria* y *A. californica* durante los primeros meses del año.



Figura 3. Camas donde se mantuvieron adultos de *A. vaccaria* y *A. californica* durante los meses de julio, agosto y septiembre.

1.2. Mantenimiento de las puestas

Cuando se observaron puestas, estas fueron retiradas del estanque, pesadas y colocadas en frascos de vidrio. A los frascos se les proporcionó aireación por medio de una piedra difusora y fueron etiquetados con la fecha en que fueron depositadas (Fig. 4). Durante el periodo previo a la eclosión se realizó un recambio de agua diario, con agua filtrada por 5 y 1 μm y pasada por UV, y se llevó un registro diario de la temperatura. Al final, se anotó la fecha en la cuál eclosionaron las larvas.



Figura 4. Frascos con puesta de *Aplysia vaccaria*, etiquetados y con piedra difusora. Se aprecia la coloración rosada de las puestas.

2. Sistemas de cultivo

Para llevar a cabo el desarrollo embrionario y larvario de las especies de *Aplysia* se pusieron a prueba dos sistemas de cultivo, uno abierto y otro cerrado. Para el sistema abierto se tomó como guía el sistema utilizado por Roger Frías Díaz (com. Personal *¹) y el sistema cerrado se realizó siguiendo lo descrito por Switzer-Dunlap y Hadfield (1981). Los dos sistemas fueron adaptados, el sistema abierto a las condiciones del Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC y el sistema cerrado a las condiciones del Laboratorio de Bioensayos II, de Acuicultura del IIO.

2.1. Sistema abierto (*A. vaccaria*)

El sistema abierto contó con las siguientes características: se utilizaron cubetas de 7.5 litros, perforadas en el centro para colocarles el tubo de desagüe y este tubo, estaba rodeado con camisas que tenían en la parte de abajo malla de 75 micras. Estas camisas se insertaban en un cople (tubo de PVC) pegado al fondo de la cubeta. En un extremo de la cubeta, en el fondo, se tenía un cople más pequeño por el que se colocaba la manguera alimentadora de agua (Fig. 5). Las cubetas fueron suministradas con agua de mar filtrada hasta 1 μm , y se realizó la limpieza del filtro diariamente. Para reducir la mortalidad ocasionada porque las larvas quedaran atrapadas en la tensión superficial se utilizaron hojuelas de 1-hexadecanol, aproximadamente 2.0 gramos de hojuelas semi-molidas y estas fueron esparcidas por la superficie de la cubeta, tal como lo muestra la figura 6.

*1 Egresado de la Facultad de Ciencias Marinas, UABC

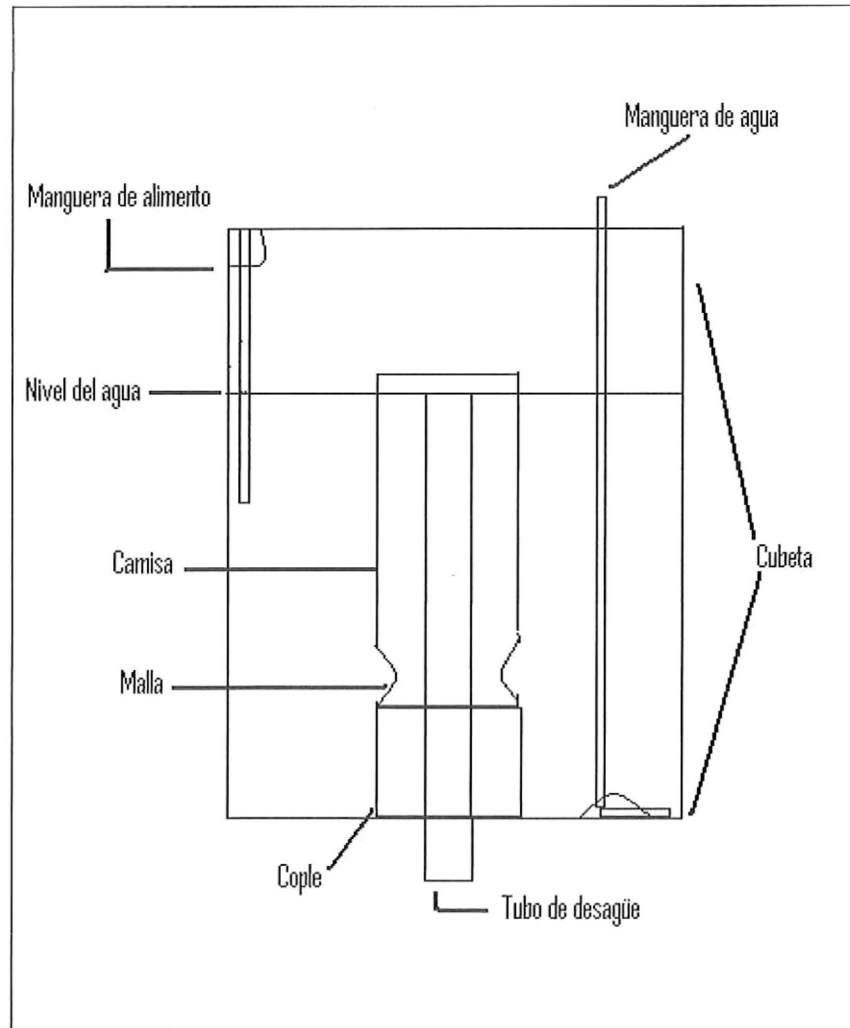


Figura 5. Esquema del sistema abierto para cultivo larvario de *A. vaccaria*.

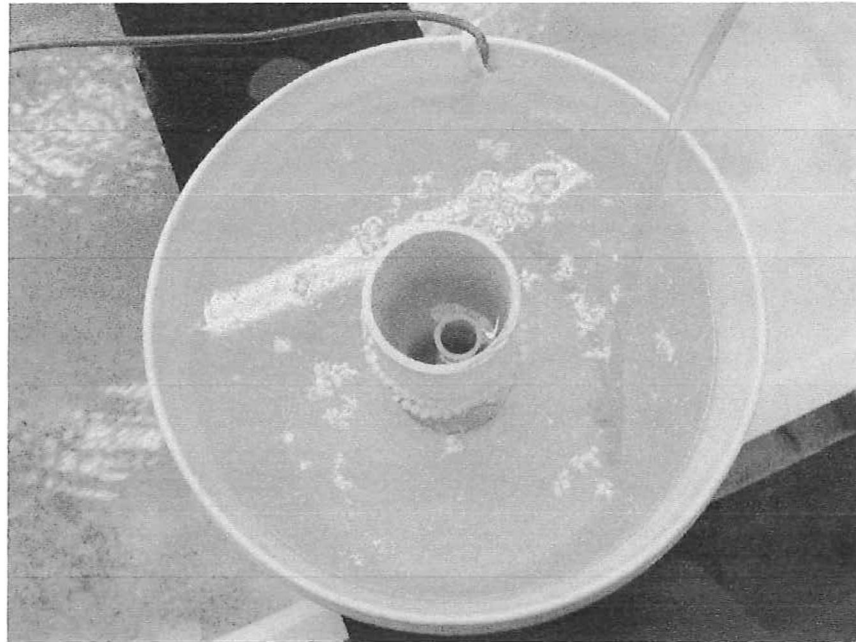


Figura 6. Sistema de cultivo abierto donde se aprecian las hojuelas de 1-hexadecanol (puntos blancos) esparcidas en la superficie.

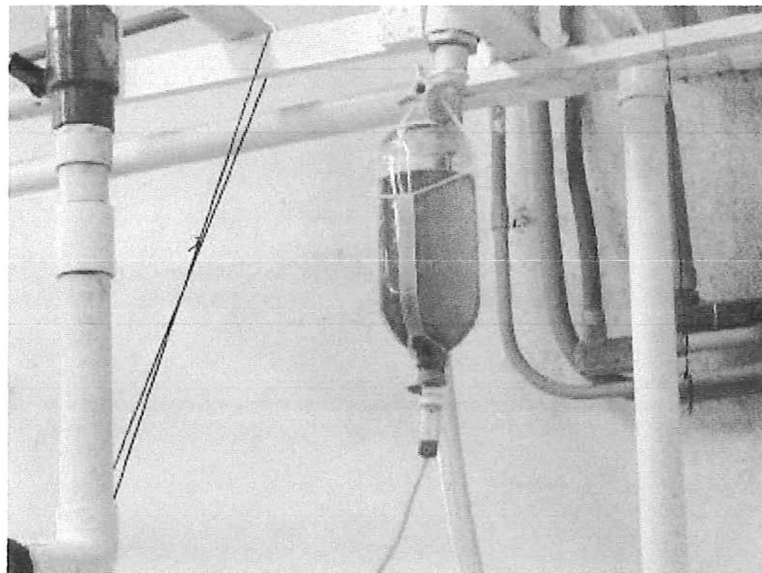


Figura 7. Sistema de alimentación utilizado para el sistema abierto.

El alimento utilizado fue la microalga *Isochrysis galbana*. Se adicionó al sistema 20,000 células por mililitro, dicha concentración se mantuvo durante toda la semana que duro el experimento. El sistema de alimentación se montó usando venoset y botellas de vidrio de las que se utilizan para administrar el suero (Fig. 7), cada cubeta tenía su sistema independiente de alimentación. La densidad de larvas fue de 6 larvas/ml. Al final de la semana se hizo un conteo de mortalidad de las larvas, y se tomaron datos de crecimiento. Para esto, las larvas fueron colocadas en un tamiz de 70 μm , con la finalidad de facilitar la toma de la muestra; simultáneamente se tomaron datos de temperatura. El experimento tuvo una duración de una semana (09 de mayo al 16 mayo del 2005), en la cuál solo se probaron dos cubetas (C1 y C2) con las mismas características, siendo C2 réplica, mencionándose en adelante como C1-C2.

2.2. Sistema cerrado (*A. californica*)

Para el sistema cerrado (Fig. 8) se probaron tres tratamientos con tres réplicas cada uno. Las referencias consultadas reportan resultados con 1 larva/ml, se quiso probar el sistema con concentraciones mayores y menores a la reportada para conocer las diferencias en densidades y determinar cual concentración sería la mejor para el sistema. Cada tratamiento manejó una densidad de larvas diferente: 0.5, 1 y 2 larvas por mililitro. Todos los tratamientos contaron con 2 litros de agua de mar filtrada a 1μ y pasada por UV, además de 0.20 gr de hojuelas de 1-hexadecanol semi-molidas y esparcidas en la superficie de los recipientes, 10 000 células por mililitro de la microalga *Isochrysis galbana* suministradas diariamente y 60 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina. El antibiótico fue

administrado cada vez que se realizó el recambio de agua. Asimismo, cada recipiente fue cubierto con plástico, para evitar que polvo o insectos cayeran en los recipientes de cultivo. Los recambios de agua se realizaron cada dos días. Para estos recambios se utilizó un tamiz de 50 μm y al término de cada semana se hizo un conteo de mortalidad y crecimiento. El experimento tuvo una duración de tres semanas, del 26 de julio al 17 de agosto, durante las cuales la medición de la temperatura se hizo diariamente.

2.3. Sistema cerrado (*A. vaccaria*)

Se realizó un último experimento con el sistema cerrado para tratar de documentar el desarrollo larvario y cultivar larva de *A. vaccaria*. El experimento (Fig. 8) fue similar al realizado con *A. californica* y las únicas modificaciones que se le hicieron al sistema fueron que el agua que se utilizó fue filtrada hasta 0.22 μm y el alimento proporcionado (*Isochrysis galbana*: 10 000 cel/ml) fue suministrado en cada recambio de agua. El experimento tuvo una duración de dos semanas, del 17 de octubre al 02 de noviembre, e igualmente se tomó la temperatura.

El análisis de los resultados de los dos sistemas se realizó con la ayuda del programa SigmaPlot 9.0, a excepción de las gráficas de temperatura que se realizaron con el programa Excel 2003.

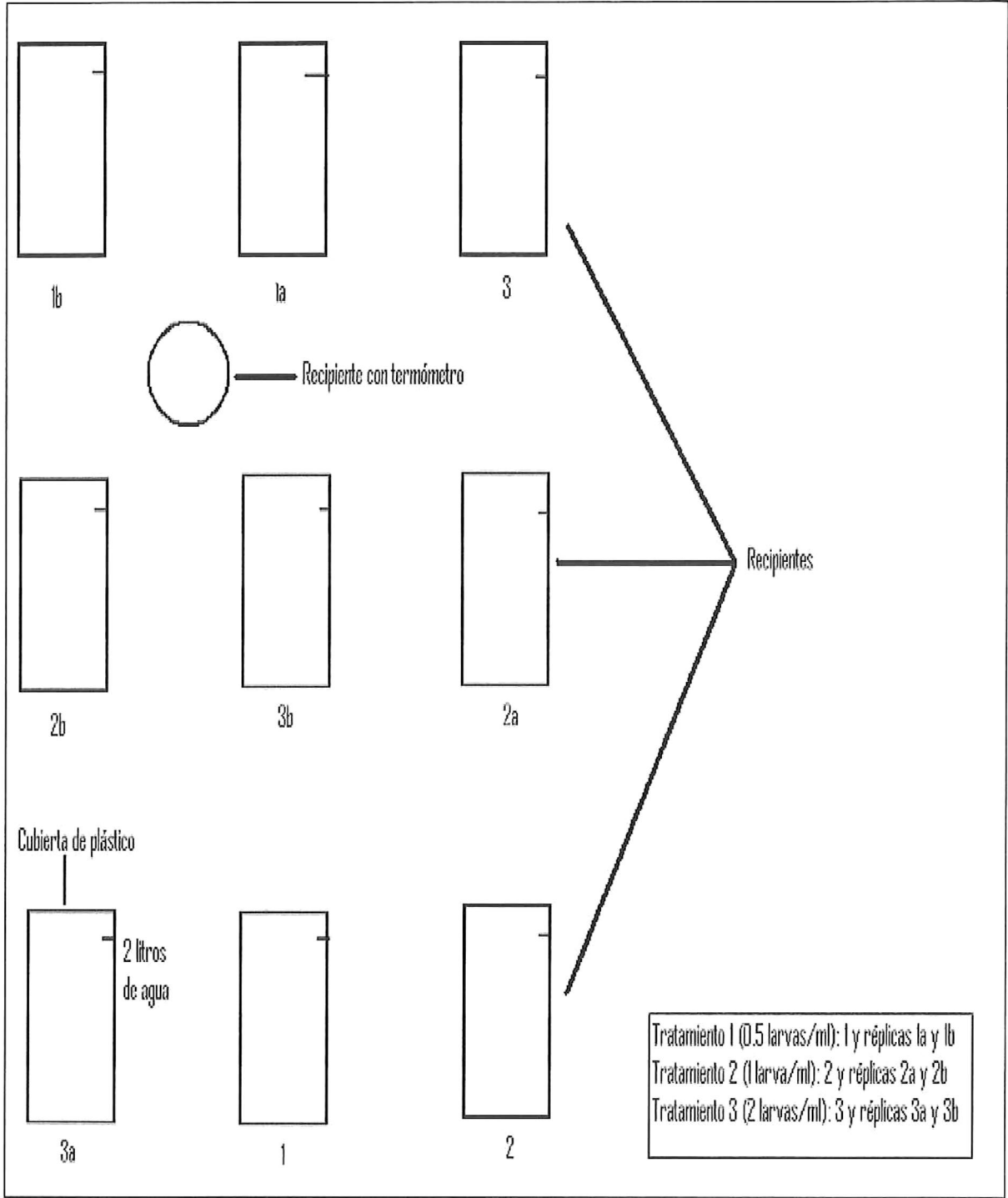


Figura 8. Esquema del sistema cerrado para *A. californica* y *A. vaccaria* . Cada uno de los rectángulos representa los recipientes del sistema.

3. Desarrollo larvario de *Aplysia vaccaria*

Se recolectaron y pesaron adultos de *Aplysia vaccaria* y se mantuvieron en un estanque de 400 litros con sistema de flujo abierto agua de mar y aireación, en el invernadero del IIO, a temperatura ambiente, (20-24 °C), durante los meses de marzo, abril, mayo y junio. Los organismos que se colectaron en el mes de septiembre se mantuvieron en camas de 200 litros del Laboratorio de Bioensayos II, de Acuicultura del IIO, a temperaturas de (13-18 °C) y con flujo abierto y aireación (ver figuras 2 y 3). Se alimentaron *ad libitum* con *Egrecia* sp y *Macrosystis pyrifer*a. Diariamente se realizó la limpieza del estanque y las camas. Las puestas que se obtuvieron (tanto en el invernadero del IIO como en el Laboratorio de Bioensayos II), fueron pesadas y colocadas en frascos de vidrio, con aireación y se etiquetaron con la fecha en que fueron depositadas (Fig. 4). Se tomó, cada 24 horas, un fragmento de las puestas para observarlas y fotografiarlas con ayuda de un microscopio Zeiss Axioscop, (se utilizaron los objetivos de 10x y 20x) y documentar el desarrollo embrionario de la especie. Una vez que las larvas eclosionaron se registraron mediciones periódicas de las larvas cada semana; para esto fueron fotografiadas con ayuda del microscopio Zeiss Axioscop, (se utilizó el objetivo de 20x) y después fueron medidas mediante el programa AxioVision AC.

RESULTADOS

1. Sistemas

1.1. Sistema abierto

Aplysia vaccaria

Las larvas recién eclosionada, tuvieron un tamaño promedio de 104.08 ± 6.45 μm . El promedio de temperatura registrado en esos días fue de 20.5 ± 1.2 $^{\circ}\text{C}$, y los datos de la temperatura registrados se muestran en la Figura 9. La Figura 10 nos muestra el crecimiento a la semana.

El porcentaje de mortalidad para la semana que duró el experimento fue de 98.95%.

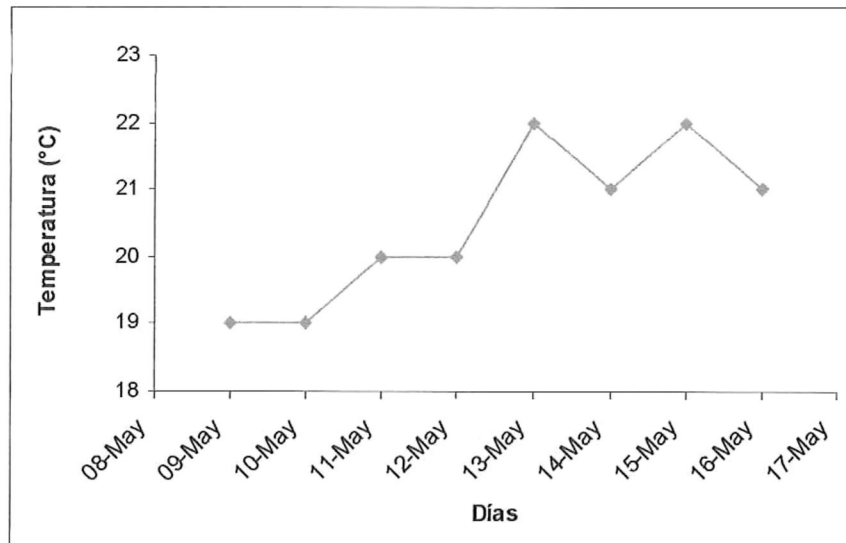


Figura 9. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) registrada a lo largo del experimento de sistema abierto para *Aplysia vaccaria*

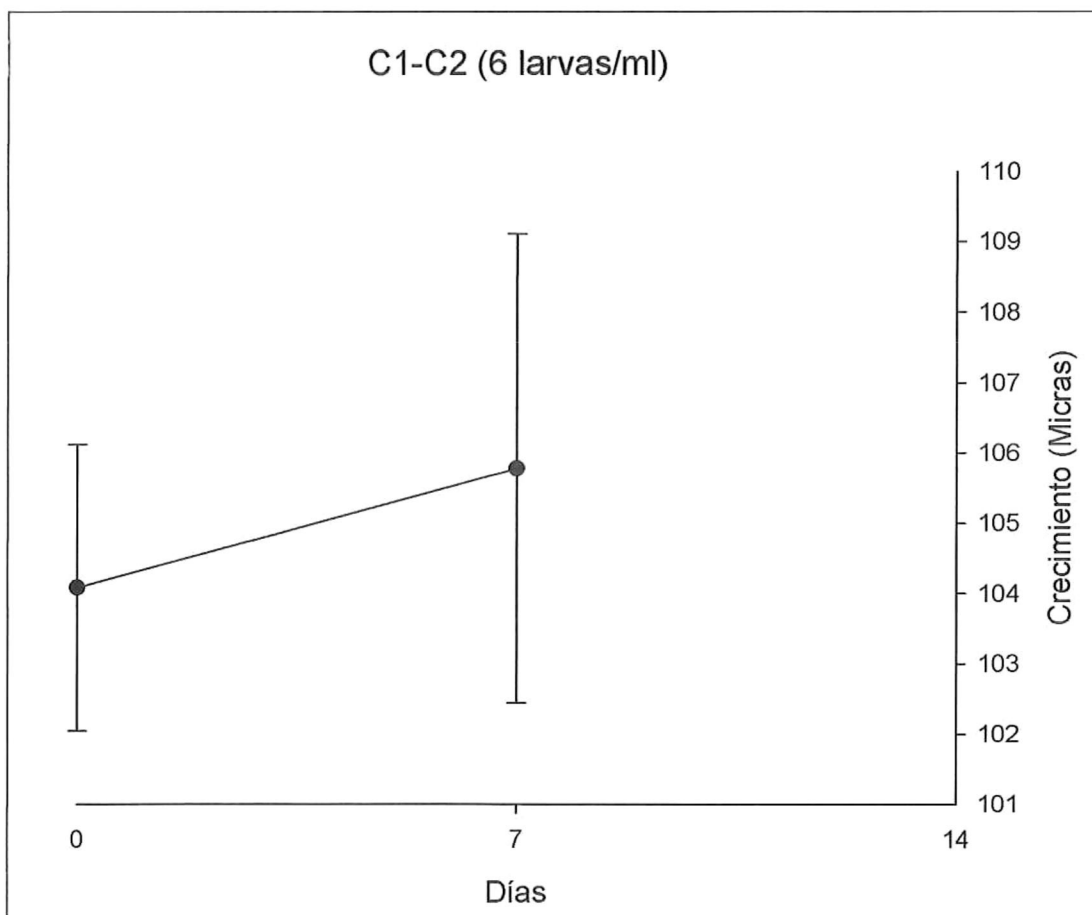


Figura 10. Crecimiento observado después de una semana de cultivo en los sistemas abiertos C1-C2 para *A. vaccaria*. Las líneas verticales nos indican el error estándar.

1.2 Sistema cerrado

Aplysia californica

El tamaño promedio de las larvas que se obtuvieron después de eclosionadas fue de 87.14 ± 3.72 micras, con unos valores máximos y mínimos de 94.26 y 81.91 micras, respectivamente. Los datos de temperatura se muestran en la Figura 11; el promedio de la temperatura fue de 15.68 ± 0.57 °C; además se obtuvo un máximo de temperatura de 17 °C y un mínimo de 15 °C.

Los datos de crecimiento fueron tomados por réplicas, pero debido a la alta mortalidad, estos no fueron suficientes en cada réplica. Por lo tanto se juntaron los datos de las réplicas de cada recipiente.

Los datos de crecimiento del Tratamiento 1 (0.5 larvas/ml) para el día 7 fueron de un promedio de 114.79 ± 16.13 micras, para el día 14 de 130.61 ± 16.77 micras y para el día 21 de 134.35 ± 10.03 micras.

Los datos de crecimiento del Tratamiento 2 (1 larva/ml) en promedio para los días 7, 14 y 21 fueron de 109.97 ± 11.15 micras, 120.40 ± 13.30 micras y 137.75 ± 21.65 micras, respectivamente.

Los datos de crecimiento para el Tratamiento 3 (2 larvas/ml) fueron en promedio, para el día 7 de 113.02 ± 7.75 micras, para el día 14 de 129.25 ± 10.95 micras y para el día 21 de 134.69 ± 15.06 micras.

Estos datos fueron utilizados para las gráficas de crecimiento semanal. La Figura 12 muestra el crecimiento semanal en los 3 tratamientos utilizados (0.5, 1 y 2 larvas / ml).

Los datos de mortalidad (promedios) tomados durante el tiempo que duró el experimento para el Tratamiento 1 a los 7, 14 y 21 días son de 16.1%, 66.42% y 88.33%, respectivamente. Para el Tratamiento 2 fueron de 19.67% a los 7 días, 53.53% a los 14 días y 90% a los 21 días, y para el Tratamiento 3 fueron a los 7 días de 20.67%, a los 14 días de 71% y a los 21 días de 96.33%. Estos datos se presentan en la Figura 13.

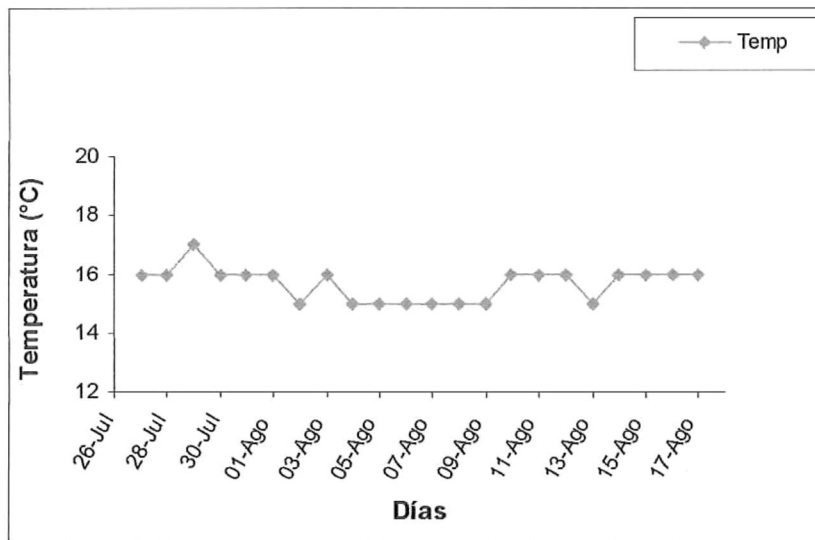


Figura 11. Temperatura (°C) registrada a lo largo del experimento de sistema cerrado para *Aplysia californica*

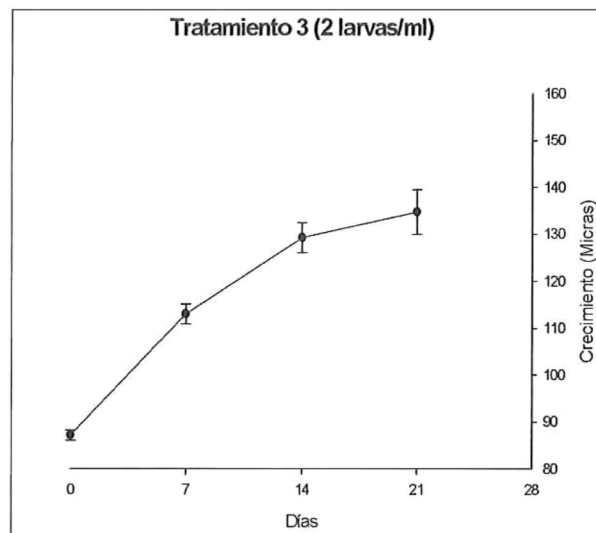
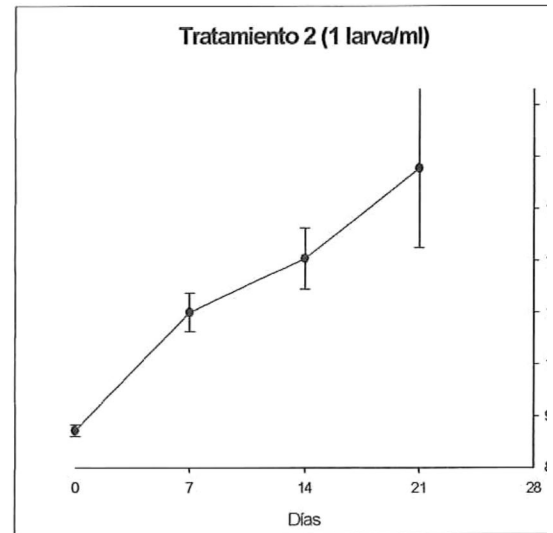
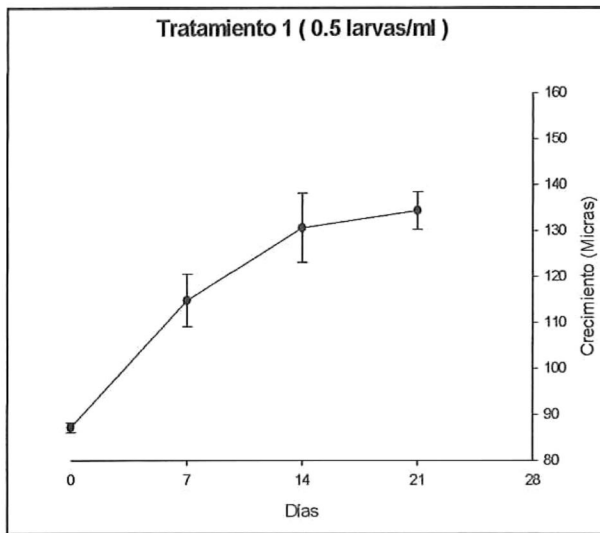


Figura 12. Crecimiento semanal en los 3 tratamientos utilizados en el sistema cerrado para *A. californica*. Las líneas verticales representan el error estándar, cada una de las gráficas representa un tratamiento con cuatro mediciones (se incluye medición de eclosión de la larva).

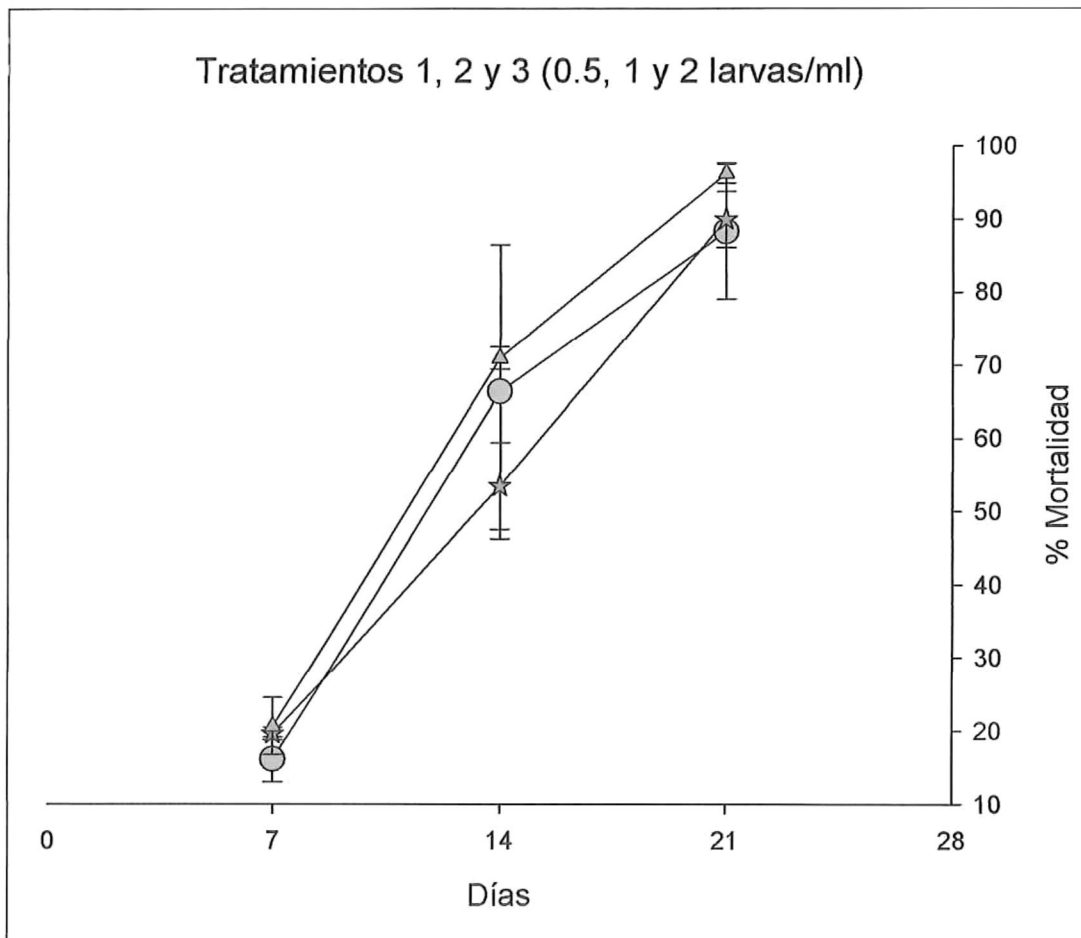


Figura 13. Porcentajes de mortalidad, en los 21 días de cultivo, para los diferentes tratamientos utilizados en sistema cerrado para *A. californica*. Las líneas verticales representan el error estándar. Donde ● representa al **Tratamiento 1**, el **Tratamiento 2** es representado por ★ y el **Tratamiento 3** por ▲.

1.3 Sistema cerrado

Aplysia vaccaria

El tamaño promedio de la larva eclosionada fue de 89.12 ± 5.49 micras, donde el valor máximo de eclosión fue de 97.93 micras y el mínimo de 80.63 micras. Los datos de temperatura se muestran en la Figura 14, el promedio de la temperatura fue de 14.25 ± 0.37 °C; con máximos de temperatura de 14.5 °C y mínimos de 13.5 °C.

Los datos de crecimiento se tomaron como para *A. californica*, e igualmente se juntaron los datos de las réplicas debido a la alta mortalidad.

El promedio de los datos de crecimiento para el Tratamiento 1 (0.5 larvas/ml) a los 10 días fueron de 143.58 ± 8.46 micras y a los 16 días fueron de 153.06 micras.

Los datos de crecimiento, en promedio, para el Tratamiento 2 (1 larva/ml) a los 10 días fueron de 146.45 ± 8.80 micras y a los 16 días de 151.02 ± 15.13 micras.

El Tratamiento 3 (2 larvas/ml) en promedio para los 10 días fue de 142.17 ± 11.22 micras y a los 16 días de 153.06 micras.

Estos datos fueron utilizados para las gráficas de crecimiento semanal. La Figura 15 muestra el crecimiento semanal en los 3 tratamientos utilizados (0.5, 1 y 2 larvas / ml).

Los promedios de mortalidad tomados para el sistema fueron, para el Tratamiento 1 a los 10 días de 44% y a los 16 días de 94.44%. Para el Tratamiento 2 son de 48.72% a los 10 días y de 95.67% a los 16 días, y por último para el Tratamiento 3 se registraron datos de 66.11% de mortalidad a los 10 días y del 96.94% a los 16 días. Estos porcentajes de mortalidad están representados en la Figura 16.

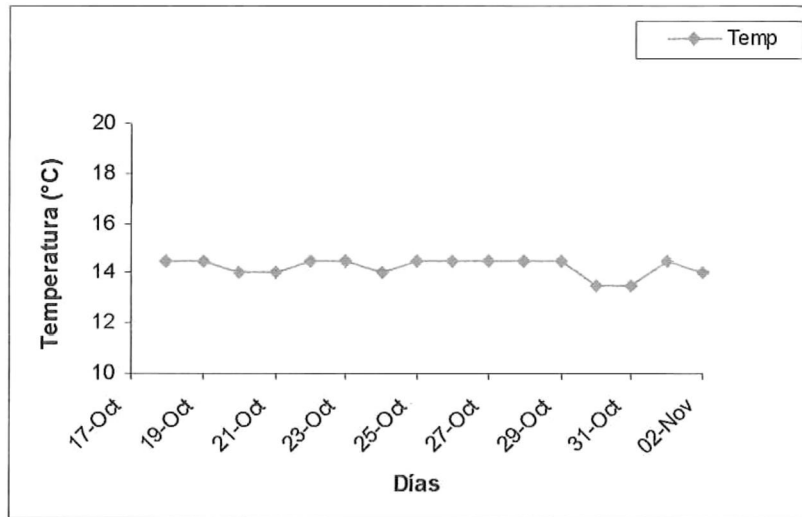


Figura 14. Temperatura (°C) registrada a lo largo del experimento de sistema cerrado para *Aplysia vaccaria*

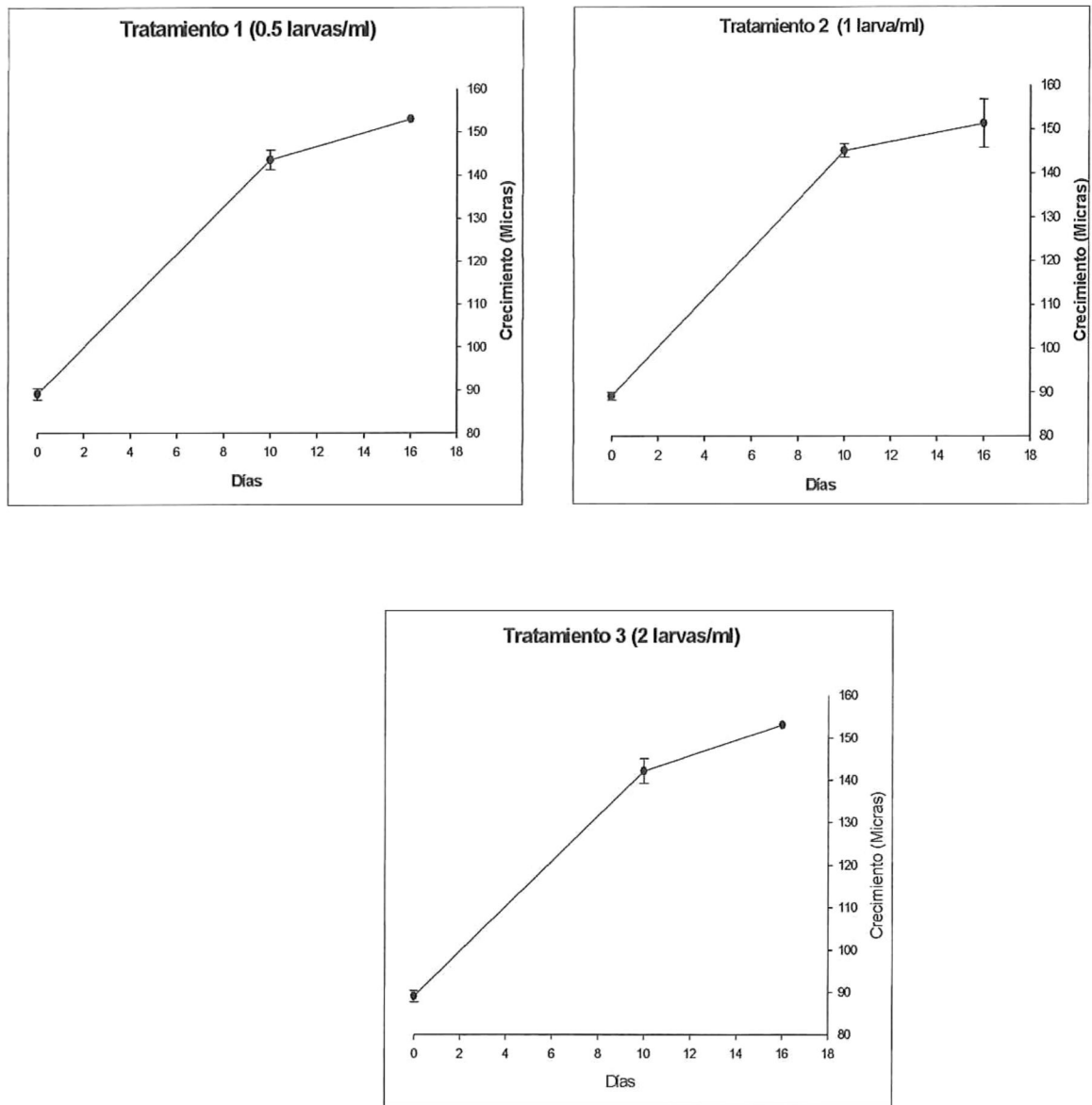


Figura 15. Crecimiento semanal en los 3 tratamientos utilizados en el sistema cerrado para *A. vaccaria*. Cada una de las gráficas representa un tratamiento, con tres mediciones cada uno (incluida la medición de eclosión de la larva), las líneas verticales representan el error estándar.

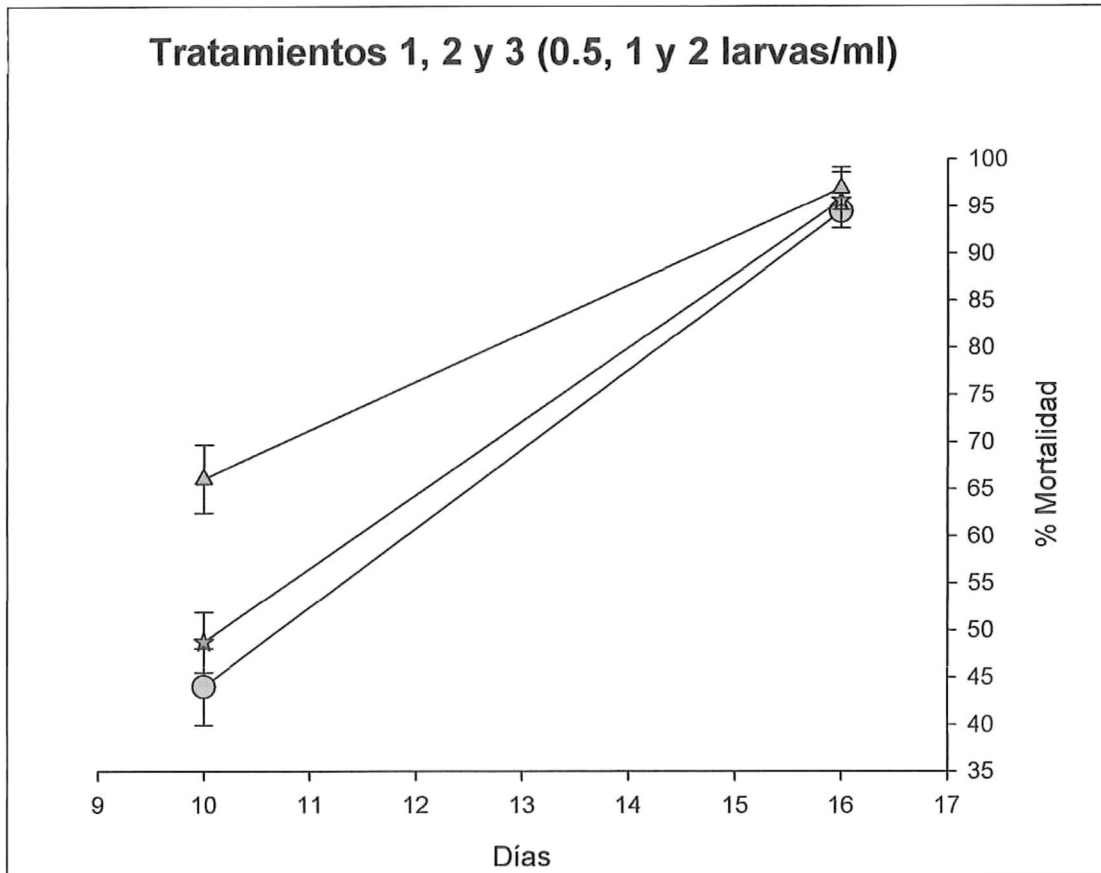


Figura 16. Porcentajes de mortalidad, en los 16 días de cultivo, para los diferentes tratamientos utilizados en sistema cerrado para *A. vaccaria*. Donde \circ representa al **Tratamiento 1**, el **Tratamiento 2** es representado por \star y el **Tratamiento 3** por \triangle . Las líneas verticales representan el error estándar.

2. Desarrollo larvario

2.1 Reproductores y puestas

Se recolectaron 12 organismos de *Aplysia vaccaria* (Fig. 17), de los cuales 8 organismos fueron pesados, ya que los otros murieron antes de ser pesados, obteniéndose un peso promedio de 1263.35 ± 602.67 gramos. Se logró pesar un organismo con 15 días de diferencia, teniendo su primer peso de 254.43 gramos y su segundo peso de 656 gramos. Se recolectaron 38 puestas (Fig. 18) con un peso promedio de 58.44 ± 40.45 gramos. La Figura 19 nos muestra los meses en los cuáles se obtuvieron puestas con mayor peso; observando que las de mayor peso se obtuvieron en el mes de mayo.

Los datos de temperatura de las puestas del Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, se presentan en la Figura 20, registrándose un promedio de temperatura de 20.10 ± 1.39 °C, con máximos de 23 °C y mínimos de 17 °C.

La temperatura en el Laboratorio de Bioensayos II se dividió en dos partes, la primera parte (Figura 21) presenta los datos del mes de Junio/Julio, ya que son puestas que fueron trasladadas del Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, al Laboratorio de Bioensayos II, donde se registrò un promedio de temperatura de 15.27 ± 0.63 °C con máximos de 17 °C y mínimos de 14°C.

La Figura 22 presenta la temperatura registrada para las puestas recolectadas entre los meses de Septiembre/Octubre, donde tenemos máximos de 15 °C, mínimos de 13.5 °C y una temperatura promedio de 13.9 ± 0.38 °C.

Las larvas en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC eclosionaron entre los 15-16 días después de que se obtuvieron las puestas, no sucedió lo mismo con las últimas puestas del mes de junio, ya que éstas fueron eliminadas por presentar un mal desarrollo larvario. Mientras que en el Laboratorio de Bioensayos II las larvas eclosionaron de 23-24 días después de que se obtuvo la puesta, a excepción de las últimas puestas del mes de septiembre, que se eliminaron por presentar un mal desarrollo larval.



Figura 17. Adulto de *Aplysia vaccaria*. El peso promedio de los 8 organismos recolectados fue de 1263.35 ± 602.67 gramos.

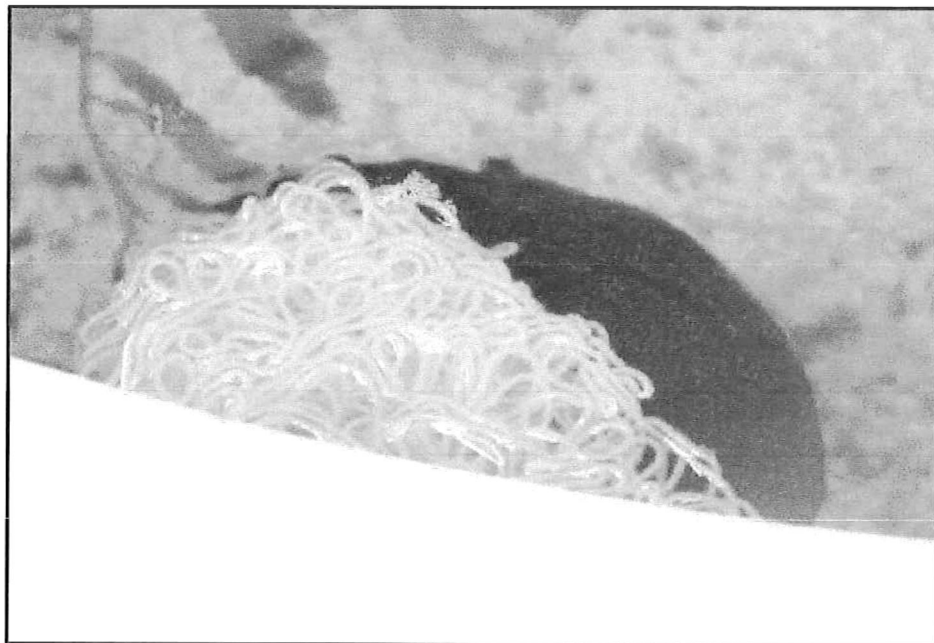


Figura 18 Puesta de *A. vaccaria*

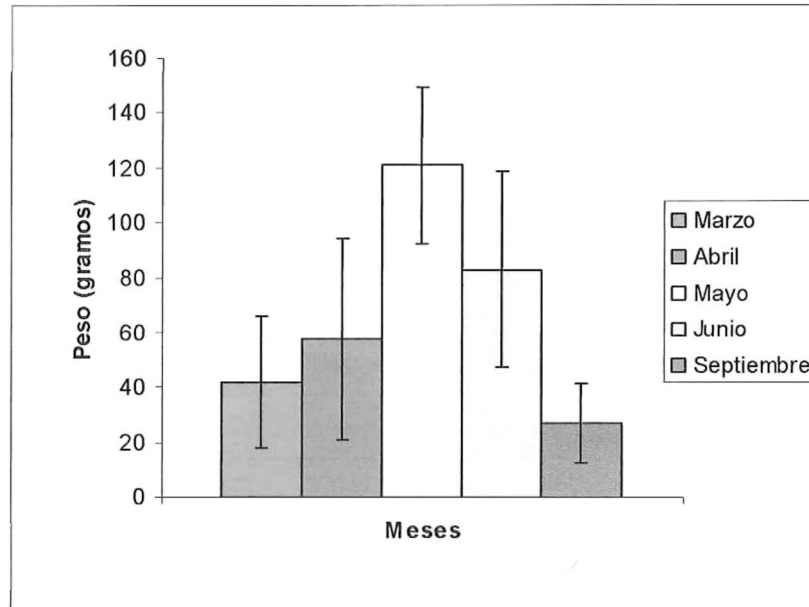


Figura 19. Pesos por mes de las puestas de *A. vaccaria* recolectadas a lo largo del experimento. Las barras indican el peso promedio por mes y las líneas verticales representan el error estándar.

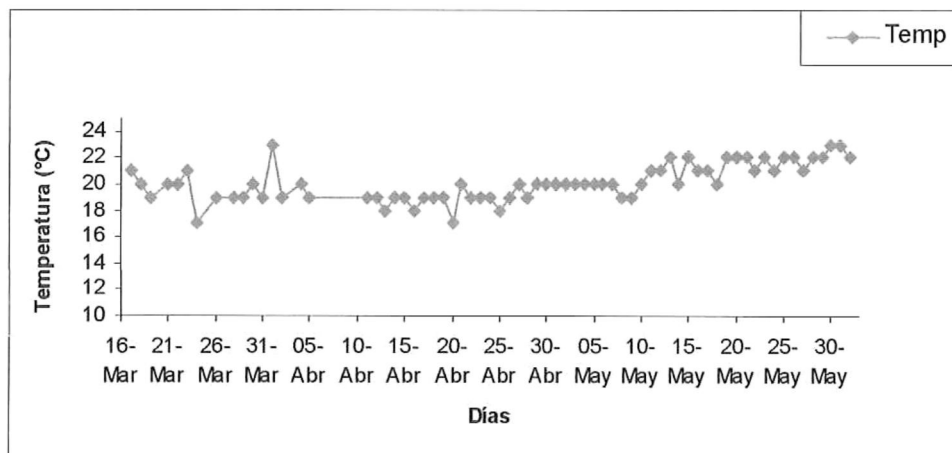


Figura 20. Temperatura (°C) del agua en el que están las puestas de *A. vaccaria* registrada en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC.

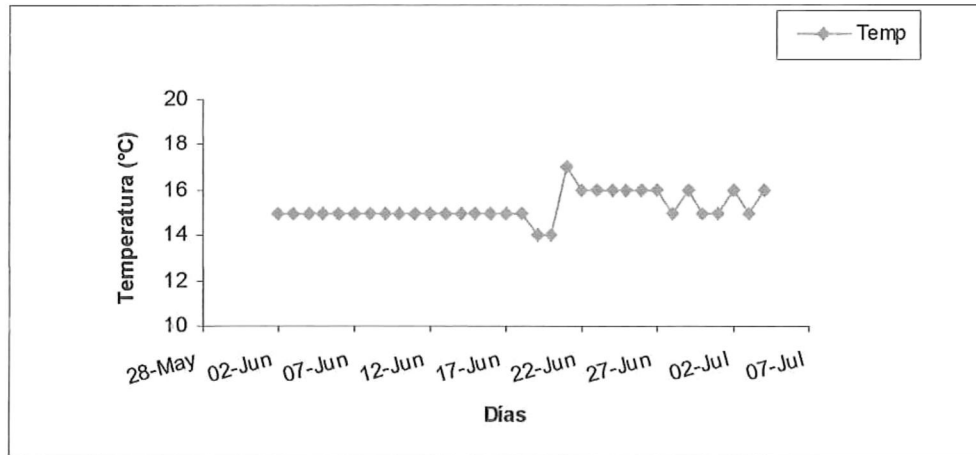


Figura 21. Temperatura (°C) del agua en el que están las puestas de *A. vaccaria* registrada en el Laboratorio de Bioensayos II (Junio/Julio)

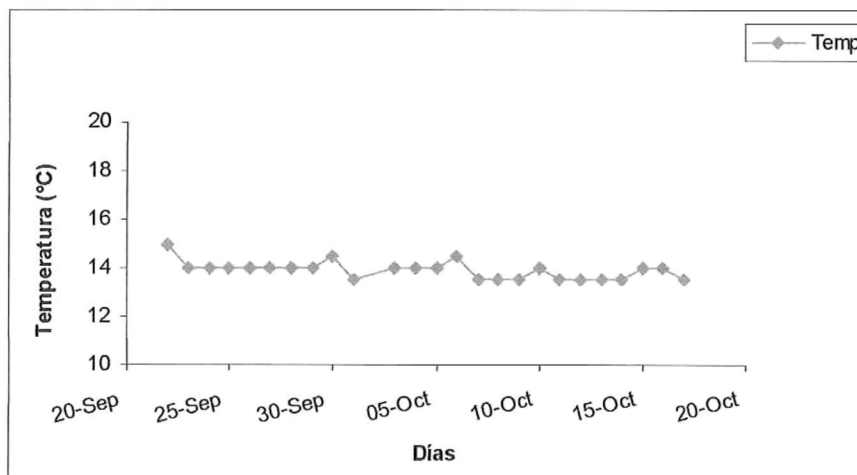


Figura 22. Temperatura (°C) del agua en el que están las puestas de *A. vaccaria* registrada en el Laboratorio de Bioensayos II (Septiembre/Octubre)

2.2 Desarrollo larvario

El desarrollo embrionario ocurrió dentro de los sacos o cápsulas que a su vez, están embebidos en una masa gelatinosa, la cuál protege a los embriones (Fig. 23). Posteriormente ocurrió la división en espiral del embrión, dando lugar a los blastómeros, en la cuál las células largas serán los macrómeros, los que se encuentran en el polo vegetal; mientras que las células pequeñas son los micrómeros, y se localizan en el polo animal (Brusca *et al.* 1997), como se observa en la Fig. 24 . Las Figuras 25, 26 y 27 nos muestran la continuación de la división en espiral, para después dar paso a la blástula y posteriormente al proceso de gastrulación (Brusca *et al.* 1997). A los 9 días se observó movimiento en los embriones (Fig. 28) y a los 10 días se observaron las primeras larvas trocóforas (Fig. 29) . A los 12 días observamos el desarrollo de las primeras larvas véliger tempranas (Fig. 30). En los días siguientes, observamos como esas larvas véliger fueron creciendo (Fig. 31 y 32). Finalmente, una vez que la larva eclosionó, se observaron con mayor claridad algunas de sus estructuras como el velum, que es el órgano locomotor primario que utiliza para nadar; los cilios que los utiliza para alimentarse; la concha la cuál utiliza como protección de los órganos internos, el estómago el cuál también fue observable (Figura 33). Cuando la larva se encuentra estresada, retracta el pie y el opérculo para protegerse, estas dos estructuras también fueron observadas. El pie es un músculo que ayuda a la circulación del agua mediante contracciones para que los cilios atrapen alimento, además contiene los órganos del equilibrio (estatocistos), secreta y contiene al opérculo, además de ayudar en la metamorfosis de la larva para adherirse al sustrato; el opérculo esta formado por

secreciones córneas que cierran perfectamente a la concha (Collier, 1997). Se observó además, la estructura conocida como “riñón de la larva”, que es una estructura prominente en la parte derecha de la cavidad del manto, este “riñón” ha sido poco estudiado, pero se sabe que es una estructura intensamente pigmentada, la cuál esta involucrada en tomar los compuestos orgánicos disueltos (Buckland-Nicks *et al.*, 2002).

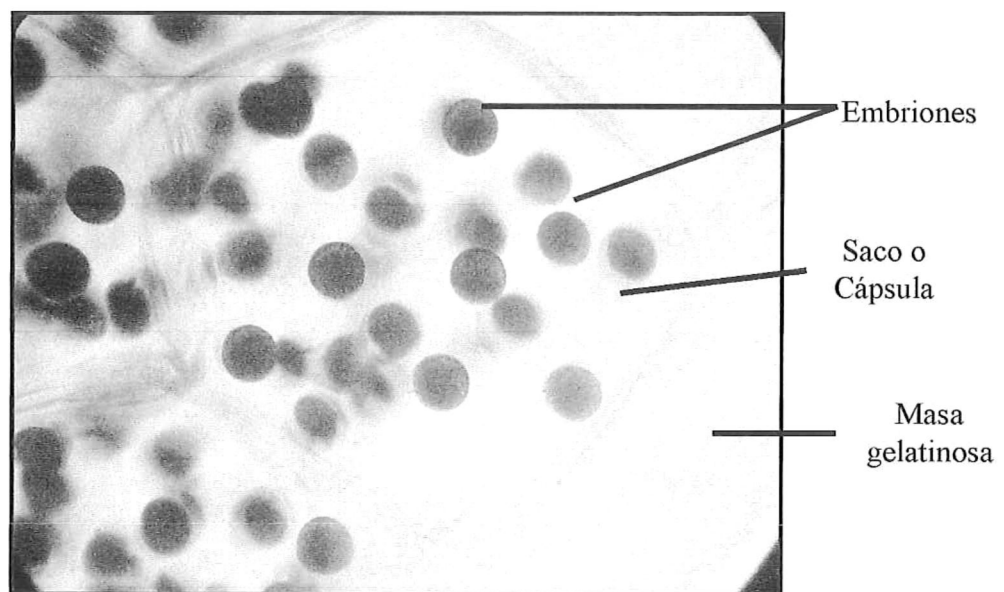


Figura 23. Puesta de *A. vaccaria* en donde se observan los embriones al inicio de su desarrollo, contenidos en sus cápsulas (Objetivo 10x)

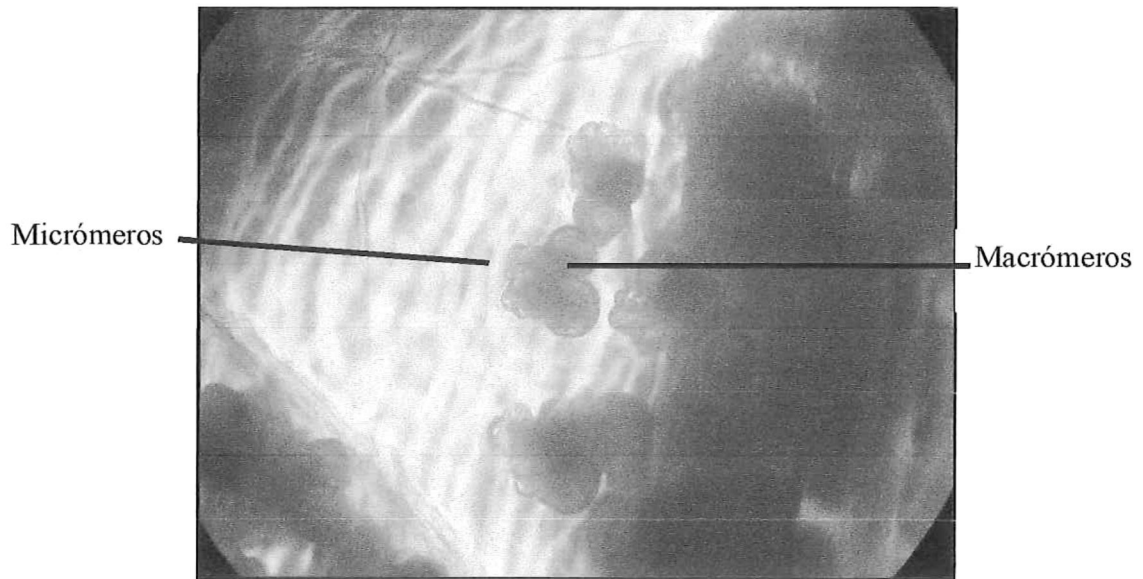


Figura 24. División en espiral de *A. vaccaria* a las 24 hrs (Objetivo 20x)

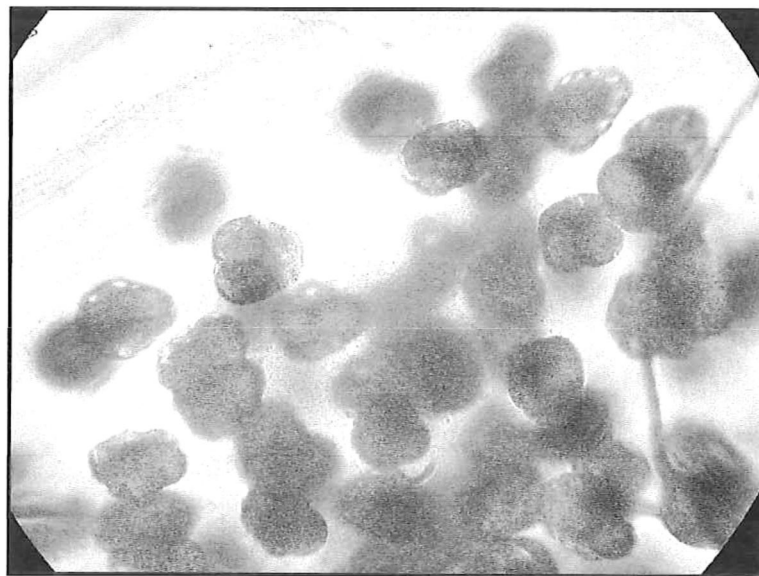


Figura 25. Continuación de la división en espiral de *A. vaccaria* a las 48 hrs (Objetivo 20x)

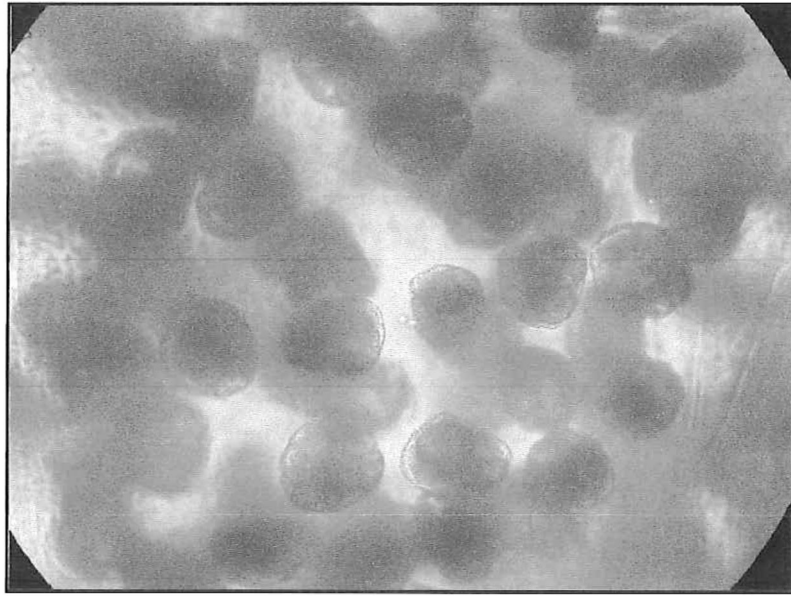


Figura 26. Continuación de la división en espiral de *A. vaccaria* a las 72 hrs (Objetivo 20x)

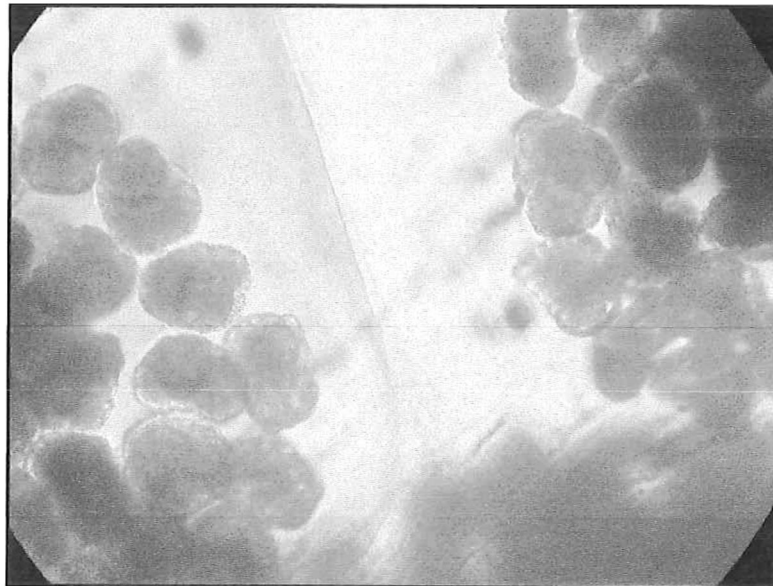


Figura 27. Continuación de la división en espiral de *A. vaccaria* a los 5 días (Objetivo 20x)

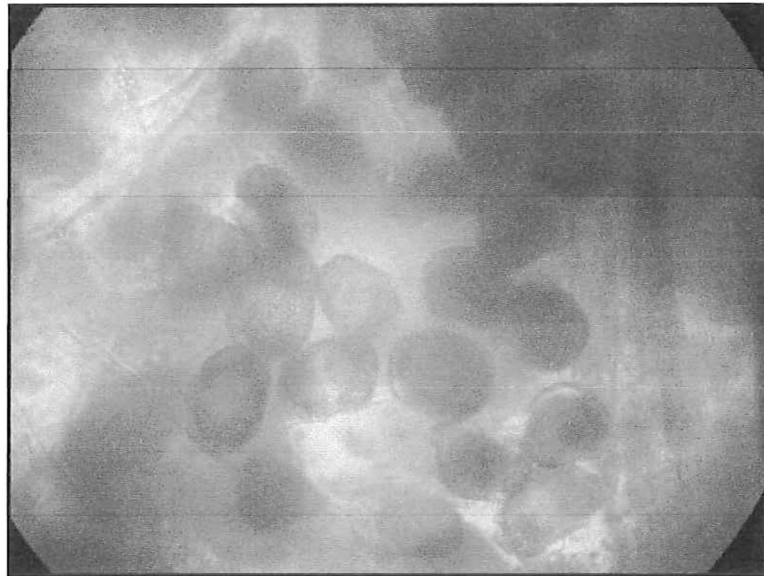


Figura 28. Primeros movimientos de los embriones de *A. vaccaria* a los 9 días (Objetivo 20x)

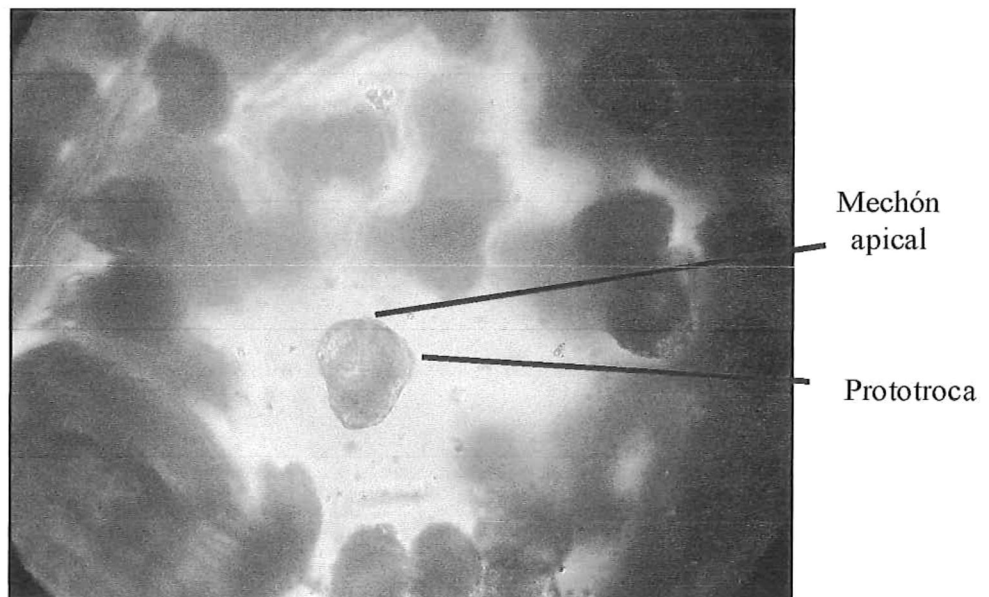


Figura 29 Larva trocófora de *A. vaccaria* a los 10 días (Objetivo 20x)

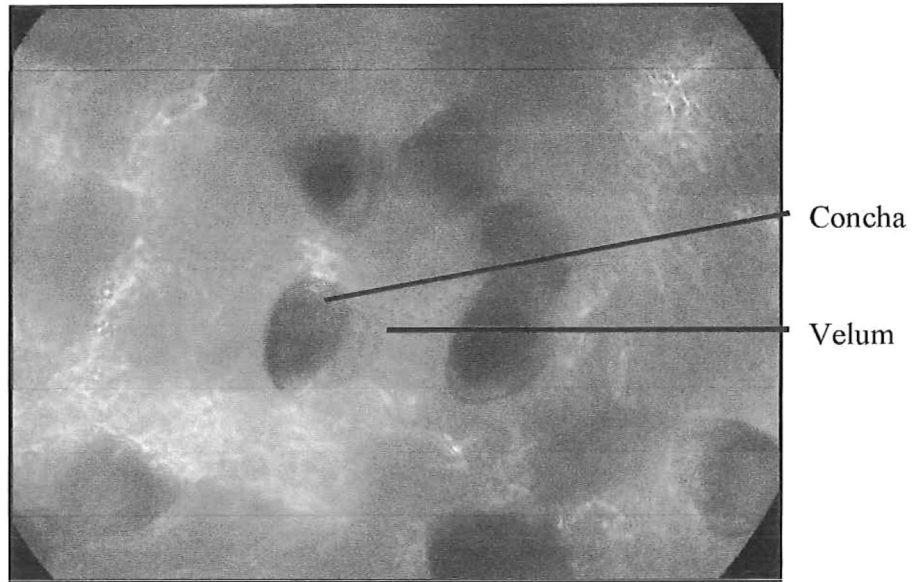


Figura 30. Desarrollo de larva véliger de *A. vaccaria* a los 12 días (Objetivo 20x)

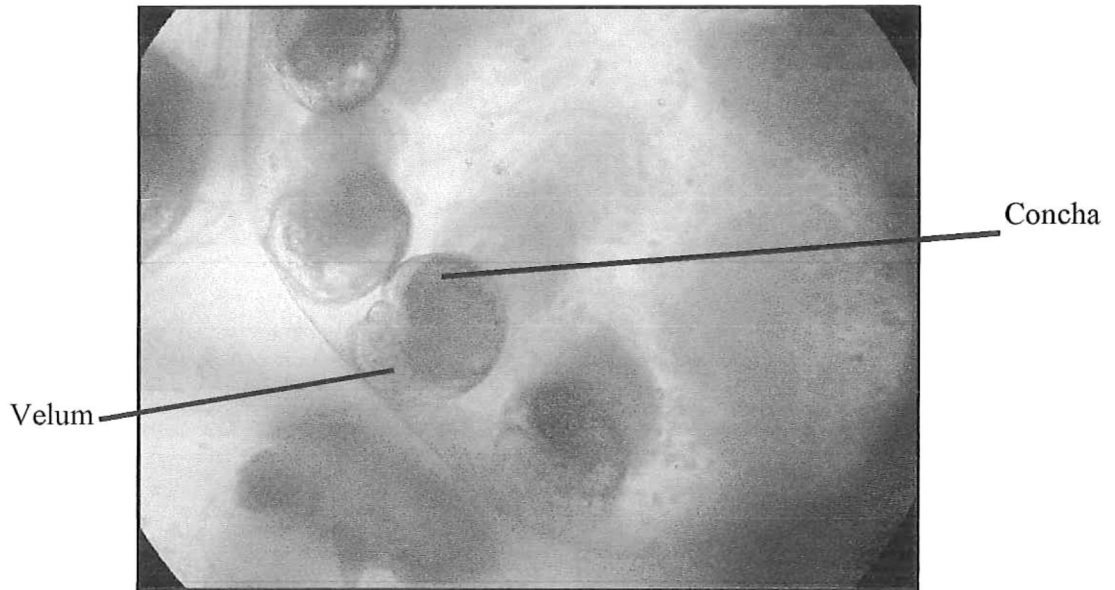


Figura 31. Desarrollo de larva véliger de *A. vaccaria* a los 13 días (Objetivo 20x)

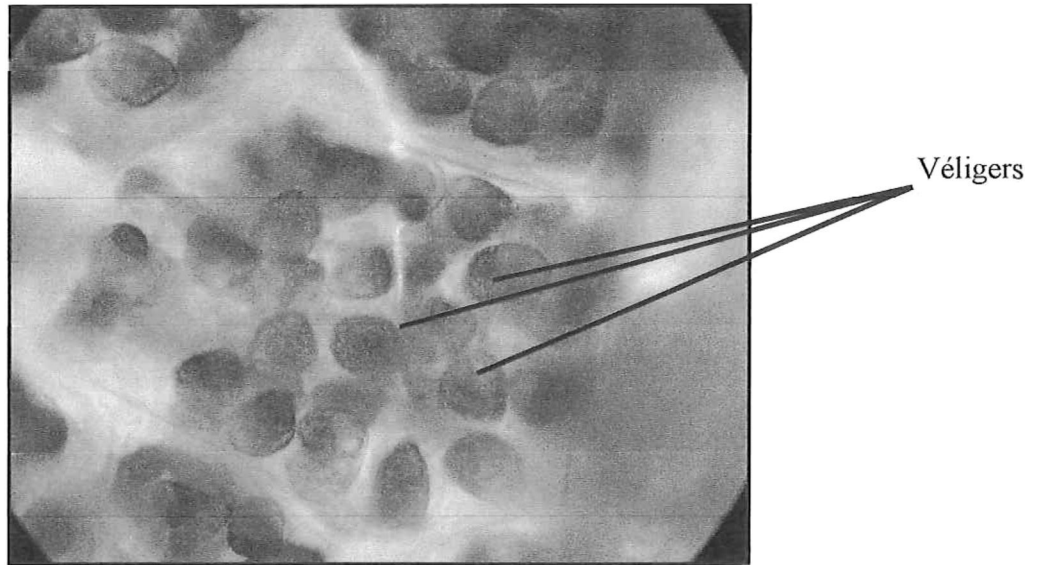


Figura 32. Desarrollo de larva véliger de *A. vaccaria* a los 15 días (Objetivo 10x)

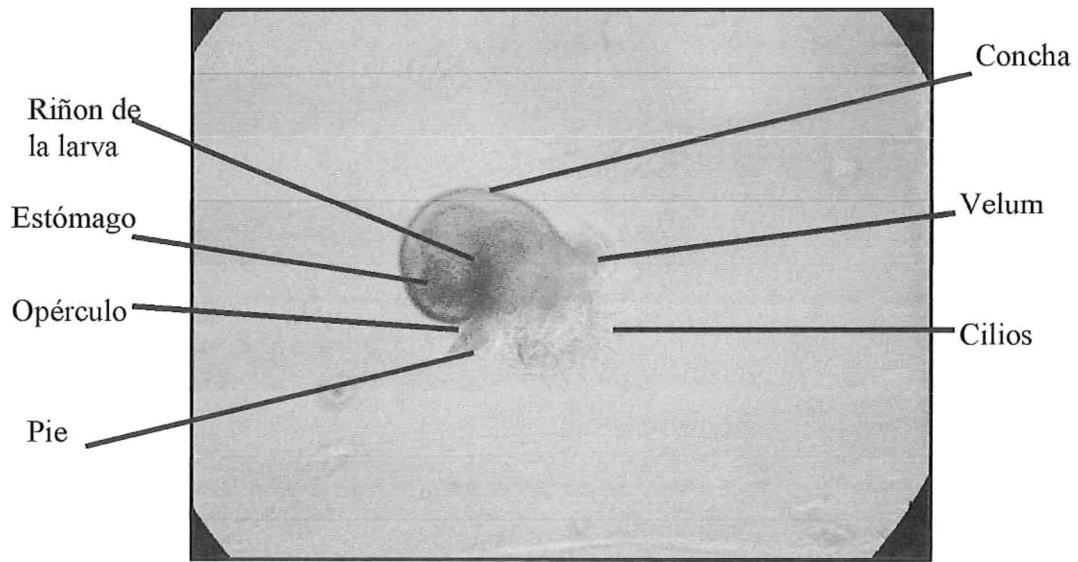


Figura 33. Larva véliger eclosionada de *A. vaccaria* a los 17 días (Objetivo 20x).

Tamaño: 153 micras

DISCUSIÓN

1. Sistema de cultivo

1.1 Sistema abierto (*A. vaccaria*)

Para los siete días de duración del sistema abierto, se tienen datos de mortalidad muy altos (98.95%) y datos de crecimiento (Figura 10) no significativos, ya que por la duración del experimento no se logran apreciar muy bien. Los datos de eclosión de las larvas para *A. vaccaria* son de 104.08 ± 6.4 micras.

El experimento sólo duró una semana ya que existieron condiciones de marea roja durante el tiempo que se puso a prueba y estas condiciones de marea roja hicieron que el experimento se contaminara con microorganismos, además por esas fechas, la temperatura (Figura 9) iba en aumento, lo que ocasionaba daño a las larvas y con esto, la proliferación de protozoarios en el sistema.

El sistema como fue planteado (Fig. 5) y el sistema de alimentación (Fig. 7) fueron sencillos de construir, el problema fue la limpieza, ya que el filtro de 1 micra que se utilizó no fue suficiente para mantener el agua limpia.

Una forma que podría funcionar sería pasar primero el agua de mar por filtros de 5 y 1 micras y después pasar por UV, esto con el fin de mantener el agua más limpia. Un problema que esto representa, es un problema de costos, ya que se necesitaría construir una toma de agua especial para el sistema de *Aplysia*, que incluya los filtros de 1 y 5 micras y el filtro de UV, esto es, un filtro de UV para un sistema solamente, lo cuál es muy costoso, ya que además de esto como es sistema abierto, el filtro UV tendría que estar prendido diariamente y el tiempo de utilidad del filtro sería mas corto.

En lo que se refiere a el uso del 1-hexadecanol se observa la disminución de larva pegada a la interfase agua-aire. Lo que se realizó en este experimento fue moler las hojuelas de 1-hexadecanol (Fig. 6), ya que de esta forma se logra cubrir una mayor superficie del recipiente que si solo dejaras las hojuelas enteras en la superficie.

El uso de *Isochrysis galbana* está documentado en los diferentes experimentos que se han hecho con *Aplysia*, como los realizados por Switzer-Dunlap y Hadfield (1981), Kriegstein *et al.* (1974) o los realizados por Strenth & Blankenship (1978). Las concentraciones agregadas de alimento y de larvas para el sistema fueron mayores que las utilizadas por los autores antes mencionados; ya que por ser sistema abierto, presentaba características diferentes a lo probado en el sistema cerrado utilizado por los mencionados autores.

1.2 Sistema cerrado (*A. californica* y *A. vaccaria*)

El sistema cerrado para *A. californica* fue montado casi a finales del periodo en el que se tuvo marea roja. La temperatura registrada (Figura 11) es de 15.68 ± 0.57 °C, con máximos de 17 °C y mínimos de 15 °C, se trato de tener un control sobre la temperatura, ya que el experimento se realizó en pleno verano, donde las temperaturas son las más altas del año, y pueden ocasionar daños a las larvas, es por eso que se montó el experimento en Bioensayos II ya que ahí se tiene aire acondicionado, y el lugar se mantiene entre los 13-18 °C.

El sistema funcionó durante 21 días, en los cuáles, se obtuvieron larvas que eclosionaron a un tamaño de 87.14 ± 3.72 micras, tamaño muy por debajo de las 125 micras registradas por Kriegstein (1977). Esperábamos tener un tamaño cercano a este

último, pero el obtener estos resultados nos hace pensar que los embriones no eran de muy buena calidad, o que el medio en el que se desarrollaron presentaba características adversas a su desarrollo, pero aún así se alcanzó a completar el desarrollo y se logró la eclosión de las larvas, aunque factores externos como protozoarios y la contaminación por un alga café, ambos problemas originados por la limpieza del sistema ya que se paso por un periodo de marea roja, originaron que la etapa planctónica no se completara.

Cuando se observa el crecimiento semanal (Fig. 12), podemos ver que éste era un crecimiento en aumento para los tres tratamientos. Esto es más marcado en la gráfica correspondiente al tratamiento 2, donde el crecimiento para el día 21 va en aumento, parte de esto se debe a las densidades bajas en las larvas en el tratamiento 2, y por lo tanto, al mejor aprovechamiento del alimento por parte de las larvas. En el tratamiento 3, que presenta el mayor número de larvas, la competencia por el alimento es más fuerte, mientras que en el tratamiento 1, el que presenta el menor número de larvas, puede ocurrir que el alimento no sea aprovechado totalmente por la larva, lo que origine que otros organismos (protozoarios) lo consuman y empiece una competencia por alimento y espacio, esto quizá sería diferente si los tratamientos no se hubieran contaminado con microorganismos.

El porcentaje de mortalidad, para los tres tratamientos fue alto a los 21 días. Se observó (Fig. 13) que para los tratamientos 1 y 2 (0.5 y 1 larva / ml) se obtuvo un porcentaje de mortalidad ligeramente bajo en comparación del tratamiento 3 (2 larvas / ml). Esto era de esperarse, ya que a mayor densidad de larvas, la competencia ya sea de espacio o alimento es mayor, originando que las larvas mueran más rápido; también se tiene que tomar en cuenta que si se tiene un número considerado de larvas que mueren,

la proliferación de protozoarios será mas alta, compitiendo ellos también por el alimento y espacio.

Para el sistema cerrado utilizado para *A. vaccaria*, observamos que la larva eclosionada fue mayor que las eclosionadas para *A. californica*, pero menor que el registrado para *A. vaccaria* en sistema abierto. Esto hace suponer, que los meses en los que eclosionó *A. vaccaria* para el sistema cerrado son meses en los cuáles los organismos desovan, pero la calidad de las puestas no es tan alta como en las puestas que se tuvieron a principios de año. Como se observa en la Figura 14, son temperaturas bajas las que se obtuvieron en esos meses.

En el tiempo que dura el experimento se puede apreciar que el crecimiento semanal va en aumento para los tres tratamientos, al igual que la mortalidad, ya que para el día 16 los tres tratamientos presentan una mortalidad muy alta. Observando que para el Tratamiento 3, que es el que presenta el mayor número de larvas, y que por lo tanto la competencia entre alimento será mayor, esta mortalidad es más alta desde la primera semana (Figura 16).

Para las dos especies en sistema cerrado, se utilizó el 1-hexadecanol molido, que al igual que en el sistema abierto nos da buenos resultados; así como el alimento.

Como forma de comparación entre los dos sistemas cerrados utilizados, vemos que las mortalidades más altas las presentó el Tratamiento 3, que es el tratamiento que presenta mayor densidad de larvas en el sistema. Pero para el sistema cerrado utilizando *A. vaccaria*, esta mortalidad alta en los tres tratamientos, es mucho mas marcada desde la primera semana, esto se debe quizá a que las puesta que se utilizaron correspondían a

la etapa final del periodo reproductivo y por lo tanto, los embriones no eran tan aptos para el desarrollo larvario, existiendo por esto mayor mortalidad desde el primer conteo.

Los problemas que se presentaron en el sistema cerrado, para las dos especies, fue el de la limpieza. Las larvas de *Aplysia* son extremadamente frágiles, y aunque se pasaba el agua por UV y se filtraba hasta 0.22 μm para *A. californica* y para *A. vaccaria* y además se utilizaba el antibiótico, no se mantuvo un sistema bajo en protozoarios. Sabemos que las condiciones ambientales en las que trabajamos (marea roja) afectaron mucho en los sistemas y en el método de filtrado, por lo que suponemos que en condiciones normales, la contaminación por protozoarios sería menor.

2. Desarrollo larvario

2.1 Reproductores y puestas

Los organismos de *A. vaccaria* que se recolectaron, son organismos con pesos grandes en comparación de *A. californica*; se tienen pesos registrados de *A. vaccaria* de aproximadamente 14 kg (Behrens, 1991). El organismo que se logró pesar con 15 días de diferencia, mostró que el crecimiento de estos organismos se da rápidamente, ya que en un periodo corto había casi triplicado su tamaño, de 254.43 gramos a 656 gramos.

Las puestas con mayor peso se presentan en el mes de mayo (Figura 19), que aún es un mes de primavera y como lo indica Angeloni *et al* (1999) es posible que en esta estación el apareamiento sea mayor. Winkler (1954) reporta que los meses de desove se dan en Febrero y Marzo; pero Angeloni *et al* (1999) menciona que *A. vaccaria* no está limitada para reproducirse solo en esos meses, y que sus puestas pueden encontrarse todo el año, lo que coincide con nuestros datos, ya que tuvimos puestas en diferentes

meses del año y por lo tanto, el apareamiento se dió en meses fuera de los que establece como límite Winkler (1954).

Los datos de temperatura para el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC (Figura 20) aumentaron mucho en el mes de mayo por eso que las siguientes puestas se pasaron al Laboratorio de Bioensayos II (Figuras 21 y 22). En la figura 21 se observan datos de temperatura del mes de junio y julio, que son puestas que se obtuvieron en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos IIO-UABC, pero que luego pasaron al Lab. de Bioensayos II; y la figura 22, es para las puestas que se recolectaron en el Lab. de Bioensayos II.

Observamos que las puestas en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC eclosionan entre 15 y 16 días, pero esto no sucede para las puestas del mes de junio, ya que estas presentan un mal desarrollo larvario.

Para las puestas que se tenían en el Laboratorio de Biensayos II, se tienen eclosiones de 23-24 días, a excepción de las puestas del mes de septiembre, ya que estas presentaban un mal desarrollo larvario.

Esto puede ser por que las puestas que estaban en el Laboratorio de Biología y Ecología del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC son a principios del año, donde puede ocurrir que la temperatura ayude a tener un desarrollo mas rápido, siempre y cuando no sea una temperatura muy alta, como les ocurre a las puestas del mes de junio que no tienen buen desarrollo larvario. Y para las puestas del Laboratorio de Bioensayos II ocurrirá que la temperatura es más baja, por lo tanto el desarrollo es mas

lento, pero aún así ocurrió un desarrollo. Solo que a temperaturas mas bajas como sucede con las puestas del mes de septiembre, el desarrollo larval no se llevó a cabo.

2.2 Desarrollo larvario

El desarrollo embrionario de *Aplysia vaccaria* se observó como el desarrollo de los aplysidos (Figs. 23-33), según lo reportado por Kriegsten (1977). Las etapas que se lograron observar fue la embriónica, (completamente), y la planctónica solo durante las primeras semanas. Se observó que el desarrollo larval se da con una división en espiral, que dará paso a una larva trocófora. Todo esto ocurre dentro de las cápsulas embebidas en la masa gelatinosa y después, cuando ocurre la eclosión, esta larva tendrá una vida nadadora libre como larva véliger y será una larva planctotrófica.

CONCLUSIONES

1. Sistemas

Sistema abierto

Aunque este sistema solo se logró probar para una semana, se observa que es un buen sistema para cultivar larvas, a pesar de que no es un sistema utilizado para el cultivo de esta especie; solo es necesario realizar unas modificaciones en lo referente al filtrado del agua. Además, la utilización de 1-hexadecanol molido es útil para incrementar la supervivencia de las larvas ya que hace una disminución en la mortalidad por tensión superficial.

Sistema cerrado

Las larvas de *A. californica* cultivadas en un sistema cerrado fueron las que tuvieron una sobrevivencia durante más tiempo, (21 días), pero presentaron un tamaño de larva bajo. Lo que nos indica que el agua de mar en la que se desarrollaron los embriones presentaba características adversas, como posiblemente baja en la concentración de oxígeno por el periodo de marea roja en que se obtuvo el agua o que eran embriones con baja calidad, debido a que las puestas correspondían a la parte final del periodo reproductivo.

En el sistema cerrado para *A. vaccaria* la larva eclosionada presenta un tamaño menor al del sistema abierto con la misma larva, esto debido quizá a que la calidad de los embriones no fue muy buena, además de los factores externos que pudieran afectar a los embriones.

El sistema cerrado es un sistema muy utilizado para este tipo de organismos, es un buen sistema, aunque es un poco más tardado que el sistema abierto, en cuanto a

limpieza. Para las dos especies en sistema cerrado, según lo observado en el experimento, el uso del 1-hexadecanol da buenos resultados, así como el alimento.

2. Desarrollo larvario

Reproductores y puestas

Los reproductores colectados de *A. vaccaria* presentaron un peso promedio de 1263.35 ± 602.67 gramos, y se observa que estos organismos rápidamente aumentan su peso, tal y como lo vimos con el organismo que triplicó su peso en 15 días. En total obtuvimos 38 puestas, con un promedio de 57.15 ± 40.45 gramos, encontrándose las puestas con mayor peso en el mes de mayo, aunque tuvimos puestas en diferentes meses del año: marzo, abril, mayo, junio y septiembre.

En los meses de primavera, la temperatura ayuda a tener un desarrollo mas rápido, originando eclosiones entre los 15-16 días; pero conforme aumenta las temperaturas (meses de verano) las larvas se ven afectadas, con eclosiones de 23-24 días, originando que tengan un mal desarrollo. Para meses de invierno el desarrollo es mas lento, por las temperaturas más bajas, solo que a temperaturas mas bajas, este desarrollo no se lleva bien a cabo, como en el mes de septiembre.

Desarrollo larvario

El desarrollo embrionario para *Aplysia vaccaria* es igual al desarrollo presentado para los aplysididos.

RECOMENDACIONES

Para el sistema abierto, se recomienda diseñar un sistema de filtrado de 5 y 1 μm y lámparas de UV para tener una mayor limpieza en el agua.

Para el sistema cerrado, en futuros experimentos, solo será necesario tomar las densidades bajas de larva y mantener un cultivo limpio, quizá utilizando filtros de 0.22 y 0.45 micras, además de agua pasada por UV.

Es recomendable utilizar las puestas que se obtengan en los meses de primavera, ya que la calidad de los embriones es mas alta. Además de que estos meses (marzo, abril y mayo) presentan las temperaturas adecuadas para un buen desarrollo tanto de embriones como de larvas (17-23 °C).

REFERENCIAS

Angeloni L., J. Bradbury & A. Chaine (1999). Growth, Seasonality and Dispersion of a Population of *Aplysia vaccaria*, Winkler, 1955. *The Veliger* 42(1):1-9.

Behrens D.W. (1991). Pacific Coast nudibranchs, A guide to the Opisthobranchs Alaska to Baja California 2nd ed. Sea Challengers. California, USA. 105pp.

Brusca G.J, R.C. Brusca & S.F. Gilbert (1997) Chapter 1. "Characteristics of metazoan development". IN: Gilbert S.F. & A.M. Raunio (eds.). *Embriology, Constructing the Organism* . Sinauer Associates, Inc. Canada, 3-19.

Buckland-Nicks J., G.Gibson & R. Koss (2002) Chapter 14. "Phylum mollusca: gastropoda", IN: Young C.M. (ed.). *Atlas of Marine Invertebrate Larvae*. Academic Press. San Diego, California, 261-265.

Beeman R.D., & G.C. Williams (1980) Chapter 14. "Opisthobranchia and pulmonata: the sea slugs and allies", IN: Morris R.H., D.P. Abbott & E.C. Haderlie (eds). *Intertidal Invertebrates of California*. Stanford University Press. Stanford, California, 313-315.

Carroll D.J., & S.C. Kempf (1990). Laboratory Culture of the Aeolid Nudibranch *Berghia verrucicornis* (Mollusca, Opisthobranchia): Some aspects of its development and life history. *Bio. Bull.* 179: 243-253.

Collier J. R (1997) Chapter 11. "Gastropods, the snails". IN: Gilbert S.F. & A.M. Raunio (eds.). *Embriology, Constructing the Organism* . Sinauer Associates, Inc. Canada, 189-217.

Cruz-Colin, M.E. (1994) Balance Sedimentario de la Bahía de Todos Santos, B.C. México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C.

Curtis H. & N.S. Barnes (2000). *Biología*. Sexta ed. en español. Editorial Medica Panamericana. España. 1491 pp.

Eales N.B., (1960) Revision of the world species of *Aplysia* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology* 5:269-404.

Farmer W.M., (1967) Notes on the Opisthobranchia of Baja California, México, with range extensions – II. *The Veliger* 9(3):340-342.

Hickman C.P., L.S. Roberts & A. Parson (1998). *Principios integrales de Zoología*. Cuarta ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 921pp.

Kriegstein A.R., V. Castellucci & E.R. Kandel (1974). Metamorphosis of *Aplysia californica* in Laboratory Culture. Vol. 71, No. 9, pp 3654-3658. September 1974.

Kriegstein A. R., (1977) Stages in the Post-hatching Development of *Aplysia californica*. 199: 275-288.

Strenth N.E., & J.E Blankenship (1978) Laboratory Culture, Metamorphosis and Development of *Aplysia brasiliana* Rang, 1828. The Veliger, Vol 21; No. I.

Switzer-Dunlap M. & M.G. Hadfield (1981). National Academy of Sciences. Laboratory Culture of *Aplysia*. IN: Marine Invertebrates. Report of the Committee on Marine Invertebrates, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 199-216.

Winkler L.R., & E. Y. Dawson (1963). Observations and Experiments on the Food Habits of California Sea Hares of the Genus *Aplysia*. Pacific Sci. 17(1):102-105.

Winkler L.R (1954). A new species of *Aplysia* on the southern California coast. Bull. South. Calif. Acad. Sci. 54:5-7.