

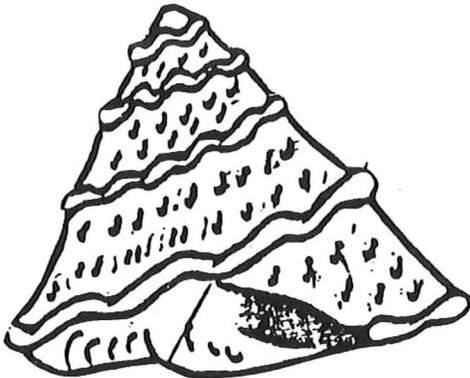
bidg



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

CARACTERIZACION DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL
DEL CARACOL Astraea undosa (MOLLUSCA: GASTEROPODA)
EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y EL EFECTO DEL USO
DE ANTIBIOTICOS



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA
LUZ MARIA YANINA GUERRERO MARTINEZ

"CARACTERIZACION DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y
LARVAL DEL CARACOL Astraea undosa (MOLLUSCA:
GASTEROPODA) EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y
EL EFECTO DEL USO DE ANTIBIOTICOS".

T E S I S

QUE PRESENTA:

LUZ MARIA YANINA GUERRERO MARTINEZ

Aprobada por:

MC. Herón Antonio Silva Loera
Presidente del Jurado

MC. Antonio Trujillo Ortiz
Sinodal Propietario

MC. Francisco Ley Lou
Sinodal propietario

Biol. Dora Waumann Rojas
Sinodal Suplente

Oc. Antonio Eliseo Almanza Heredia
Sinodal suplente

Este trabajo de tesis forma parte del proyecto de Investigación: "EVALUACION INTEGRAL DE LOS RECURSOS CON POTENCIAL ECONOMICO DE LA COSTA OESTE DE BAJA CALIFORNIA. EL CARACOL Astraea undosa (MOLLUSCA :GASTROPODA)". En la etapa de fisiología del caracol marino A. undosa, con apoyo de la Universidad Autónoma de Baja California y la Secretaría de Educación Pública, convenio Número C 87-01-0136.

DEDICATORIA

A mis padres:

Pedro Guerrero R. y Alicia Martínez M.

Quienes me dieron la vida, la oportunidad de estudiar y su ayuda incondicional durante todo este tiempo.

A mis hermanos:

Alicia, Catalina, Noemí, Joel, J.Luis, Carmen, Gloria, Gabriela y a la memoria de Jorge y Leonardo. Porque siempre me han ayudado y me han apoyado en todo.

A Martín González Rivas.

Por su compañía y ayuda en la realización de los dibujos.

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios:

Por permitirme llegar hasta este momento.

Agradezco especialmente a mi director de tesis MC. Antonio Silva Loera por su apoyo, cooperación, comprensión y paciencia durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales:

MC. Antonio Trujillo Ortiz

MC. Francisco Ley Lou

Biol. Dora Waumann Rojas

Oc. Antonio Eliseo Almanza Heredia

Por su cooperación durante la revisión de este trabajo.

RESUMEN

Se caracterizó el desarrollo embrionario y larval del caracol marino Astraea undosa a 21.6 °C (í=0.5), a partir de gametos obtenidos en laboratorio mediante inducción termal. Los huevos fueron adquiridos por fertilización in vitro. Las medidas y tiempos encontrados en términos promedio fueron: para el óvulo 209 μ m (í=15 μ m) diámetro. Espermatozoide 56 μ m (í=2 μ m) longitud total (flagelo y cabeza). La primera división sucedió a los 7 minutos (í=2) después de la fertilización. La eclosión ocurrió a las 8:15 horas (í=0:45). El estadio véliger joven apareció a las 18:40 horas (í=0:60) después de la fertilización. A las 75 horas (í=7:15) se presentaron las estructuras típicas de la +larva véliger, previas al asentamiento. El uso de antibiótico sulfametazine en concentraciones de 25 a 200 ppM no afectó el desarrollo larvario.

C O N T E N I D O

	pag
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVO	5
3. MATERIALES Y METODO	6
3.1 Descripción del área de colecta	6
3.2 Manejo de los organismos	8
3.3 Tratamiento estadístico	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	11
4.1 Aspectos generales	11
4.2 Descripción del desarrollo embrionario	14
4.3 Descripción del desarrollo larval	18
4.4 Uso de antibiótico	22
5. CONCLUSIONES	28
6. LITERATURA CITADA	30

LISTA DE TABLAS

	pag
Tabla I. Tiempo en que se presentaron las principales características del desarrollo embrionario y larval del caracol <u>Astraea undosa</u> , a 21.6 ± 0.5 °C en condiciones de laboratorio.12
Tabla II. Tiempo en que se presentaron las principales características del desarrollo embrionario y larval del caracol <u>Astraea undosa</u> , a 17 ± 1 °C en condiciones de laboratorio.13
Tabla III.- Análisis de varianza de tres vías de los datos del efecto de la concentración (CONC), tiempo (TPO) y original y replica (ORRE) sobre la sobrevivencia de larvas de <u>Astraea undosa</u> , a 21.5 °C. (5% de significancia)26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Localización del área de colecta de los organismos 7

Figura 2.- Características y estructuras durante el desarrollo embrionario del caracol marino Astraea undosa: A) Aparición del cuerpo polar, B) Primera división en dos células, C) Segunda división en cuatro células, D) Tercera división en ocho células, E) Cuarta división en 16 células, f) Mórula multicelular, G) Gástrula con cilios incipientes, móviles, H) Trocófora joven, al momento de eclosión, aún envuelta en la membrana: 1. Penacho apical, 2. Corona ciliar con gran movilidad. 16

Figura 3.- Carcterísticas y estructuras durante el desarrollo larval del caracol marino Astraea undosa: A) Trocófora joven recién eclosionada: 1. El anillo prototroco aparece mejor desarrollado, 2. Se inicia la formación de la protoconcha, B) Larva trocófora joven presenta: 1. Penacho apical, 2. Corona ciliar mas desarrollada, 3. Continua desarrollo de la protoconcha. C) Larva trócofora avanzada presenta: 1. Desarrollo del pie, 2. Músculos retractores de la concha, 3. Concha mejor desarrollada, D) Larva véliger joven presenta: 1. Pie completamente formado 2. Cilios alrededor del pie, 3. Opérculo, protuberancia de los tentáculos cefálicos, 5. Aparecen manchas oculares E) Larva véliger completamente formada, aparecen: 1. Tres ramificaciones en los tentáculos cefálicos, 2. Mayor longitud de los tentáculos cefálicos, 3. Ojos completamente visibles. . .19

Figura 4.- Efecto de la concentración de antibiótico (sulfametazine) en el desarrollo de larvas de Astraea undosa, en 21.5 °C. Las barras verticales representan la desviación standard. La flecha indica el tiempo en que aparecen las estructuras típicas previas a la metamorfosis. 23

1. INTRODUCCION

Entre los estudios básicos de biología se considera de gran importancia la caracterización del desarrollo embrionario y larval de las especies. Esta información constituye una base fundamental para identificar a cada especie y permite conocer las condiciones necesarias para la obtención y mantenimiento de larvas. Además, desde un punto de vista práctico, representa un primer paso hacia el desarrollo de una biotécnica de cultivo.

De la gran variedad de organismos cultivados, los moluscos se han constituido como uno de los grupos más importantes debido a sus hábitos alimenticios (herbívoros, filtradores y consumidores de detritus), y su cultivo representa una forma eficiente de convertir la productividad orgánica primaria en alimento para consumo humano (Mason, 1971).

Para facilitar el estudio de invertebrados a partir de cultivos se necesita conocer sus requerimientos nutricionales; así como las especies que se interrelacionan con ellos, las cuales influyen en su crecimiento, desarrollo, metamorfosis y fecundidad. Es necesario controlar el acompañamiento de microflora y microfauna, ya que estos aportan o consumen sustancias que influyen en el medio de cultivo.

Los microorganismos presentes en el cultivo de invertebrados pueden ser inhibidos o eliminados con el uso de antibiótico o una combinación de estos aunado con frecuentes lavados de los organismos en experimentación. Los antibióticos no pueden ser usados indiscriminadamente, ya que estos antibióticos pueden ser más tóxicas para el invertebrado que para el microorganismo contaminante en sí, y unos pueden ser desactivados en menor tiempo que otros. Estas combinaciones de antibióticos pueden tener un mejor efecto inhibitorio. Por esto, es necesario conocer las concentraciones de antibiótico adecuadas. Los cultivos de invertebrados favorecen la presencia de bacterias, flagelados y protozoarios que llegan a dominar en el sistema de cultivo. Tales cultivos duran tanto como el balance biótico. Los miembros que dan más problemas son especies de bacterias, hongos y protozoarios que eventualmente van causando la muerte de los invertebrados (Smith y Chanley, 1975).

El caracol Astraea undosa es un molusco que pertenece a la Clase Gasterópoda, Subclase Prosobranquia, Orden Arqueogasterópoda, que presenta sexos separados y una fertilización externa. Morrison-Abbot (1980), mencionan al respecto que otros arqueogasterópodos presentan hermafroditismo.

Mas del 80% de todas las especies de moluscos son gasterópodos, descendientes de una población de moluscos

ancestrales, quienes tienen un cambio evolutivo interno llamado torsión (Marshall, 1980). La torsión sucede durante el curso de la etapa véliger, llevada a cabo por una combinación de contracciones musculares, donde la concha y la masa visceral experimentan un giro de 180 grados en relación con la cabeza y el pie (Barnes, 1977).

Es típico de los gasterópodos marinos el estadio larval véliger (tipo de larva de nado libre), el cual presenta un órgano natatorio llamado velo con una corona de cilios nombrada prototroca. Los cilios del velo no solo actúan en la locomoción, sino también en la alimentación en otras especies. Estas larvas pueden ser autotróficas o lecitotróficas.

Durante el desarrollo de la larva véliger, la región dorsal aumenta de tamaño y su pared segrega la primera concha, la cual aparece como un caracol diminuto con una concha cónica (Haro-Vera, V. 1975).

El sistema reproductivo es similar en ambos sexos, el cual consta de una sola gónada y conducto que se comunica con el riñón derecho. Los gametos son liberados dentro del riñón y salen a través del poro renal. En unas especies de arqueogasterópodos la porción distal del ducto del riñón es modificado en una región glandular que produce una capa mucosa en cada gameto que es liberado durante el desove (Giese, 1977).

El caracol Astraea undosa, conocido también como caracol turbante, comunmente es localizado en sustrato rocoso o arenoso asociado con mantos de algas. Distribuyéndose desde Punta Concepción (Santa Bárbara, California) hasta Isla Asunción (Baja California), y conociéndose muy poco de su biología (Morrison et al., 1980).

No se encontró información acerca del desarrollo embrionario y larval de Astraea undosa, aspecto que resulta importante, tanto como un aporte a la ciencia, como un primer paso para el desarrollo de una biotecnología de cultivo.

En este trabajo fué caracterizado el desarrollo embrionario y larval de Astraea undosa bajo condiciones de laboratorio a las temperaturas promedio de 21.6 °C (í=0.5) y 17.5 °C (í=1) hasta la fase de asentamiento. Utilizándose sulfametazine como antibiótico en diferentes concentraciones (25, 50, 100, y 200 partes por millón "ppM").

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es caracterizar los diferentes estadios del desarrollo embrionario y larval del caracol Astraea undosa hasta la fase de asentamiento y el efecto en el uso del antibiótico sulfametazine.

3. MATERIALES Y METODO

3.1 Descripción del área de colecta.

La colecta de organismos fué en la Bahía de Todos Santos B.C., localizada en la costa Occidental de la Península de Baja California entre los paralelos $31^{\circ}43'$ y $31^{\circ}54'$ de latitud norte y entre los meridianos $116^{\circ}36'$ y $116^{\circ}49'$ de longitud oeste. Se encuentra parcialmente cerrada por las islas Todos Santos localizadas al oeste de la bahía ($31^{\circ}40'N$ y $116^{\circ}40'O$), Punta Banda al sur y San Miguel al norte (Secretaría de Marina, 1974) (figura 1).

En la figura 1 se muestran las dos zonas de colecta en la costa norte de la Isla Todos Santos y Punta Banda con área rocosa semiexpuesta al oleaje, ambas localizadas dentro de la Bahía de Todos Santos, B.C.. La variación anual de temperatura superficial en estas zonas es de aproximadamente $10^{\circ}C$, con un mínimo en febrero de $12^{\circ}C$ y un máximo en agosto de $22.5^{\circ}C$ (Becerril, 1988), mientras que la temperatura del fondo permanece en un promedio de $14^{\circ}C$ con un intervalo anual entre $12^{\circ}C$ y $18^{\circ}C$ (Ramade, 1989).

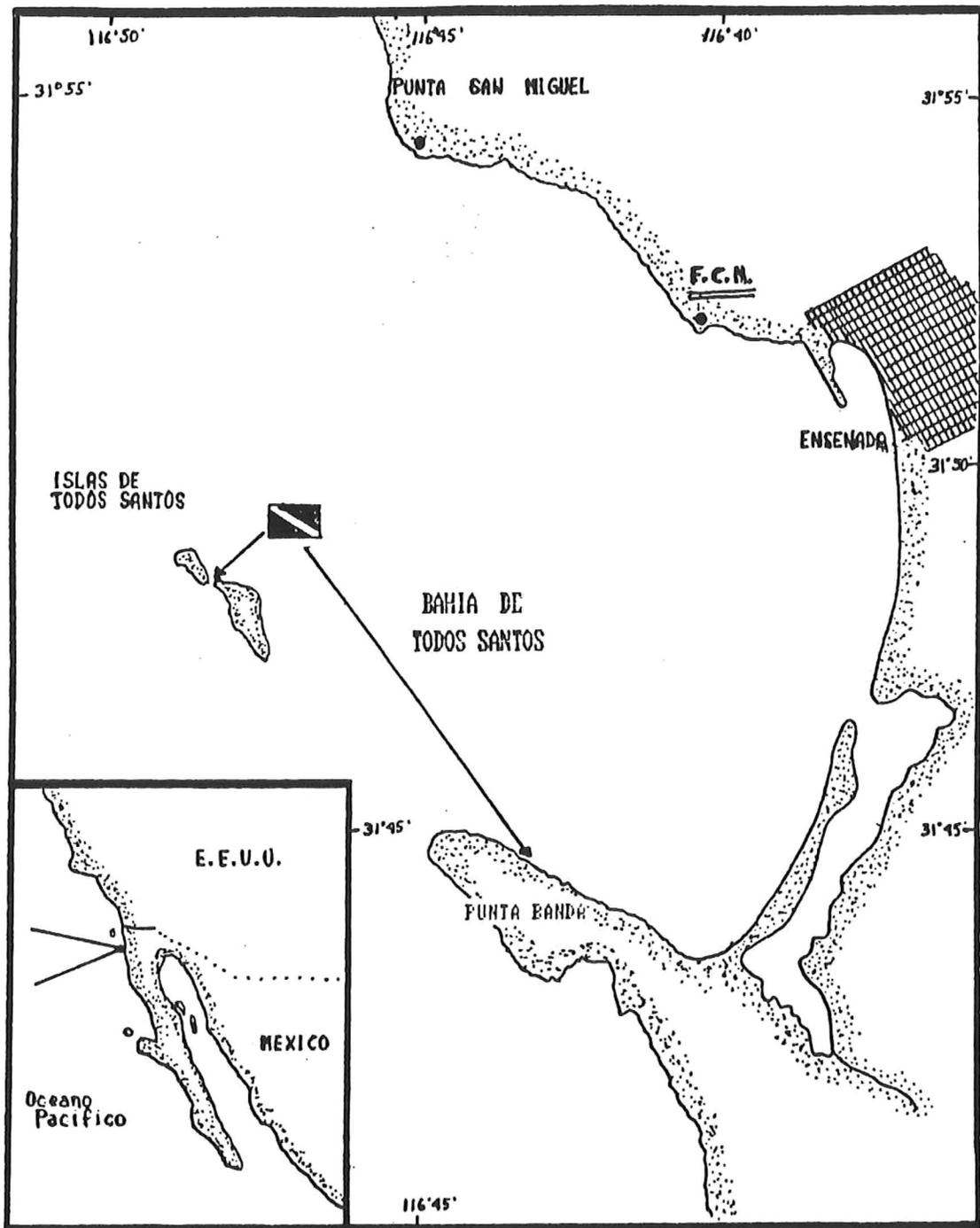


Fig.1-Localización del área de colecta de los organismos 

3.2 Manejo de los organismos.

Los organismos se mantuvieron en condiciones de laboratorio a una temperatura promedio de 18 °C ($\bar{I}=1$). Se les suministro como alimento macroalgas pardas (Macrocystis piryfera y Egrecia menziensii) manteniéndose en un sistema abierto con aireación. Los óvulos y espermatozoos se obtuvieron de estos organismos mediante desoves inducidos por variación térmica de acuerdo a lo descrito por Ibarra (1989), realizando conteos para cada hembra y macho respectivamente.

Durante la fertilización se empleó una concentración de espermatozoides de 150 a 200 por óvulo evitando que se presentará poliespermia. Los gametos fueron mezclados mediante agitación dejándose reposar por 5 minutos, posteriormente fueron enjuagados 3 veces reteniendo los huevos en una malla de 75 μ m. Durante todo este proceso fué utilizada agua de mar filtrada (AMF) a través de un filtro de 5 μ m e irradiada con luz ultravioleta (UV) a la temperatura de desove (20.5 °C).

Se realizaron 2 desarrollos a las temperaturas promedio de 17.5 °C y a 21.6 °C, observando el efecto de la temperatura sobre el tiempo en el que aparecieron los estadios de desarrollo.

Se redujo la proliferación de microorganismos patógenos indeseables utilizando penicilina a una

concentración de 250,000 UI/l realizándose cambios de agua diarios.

La observación de las características de los estadios embrionario y larval fué realizada en forma continua en cada desarrollo obteniéndose los tiempos promedio de duración de cada estadio.

En todos los experimentos se registraron, en función del tiempo, las características observadas (morfológicas, estructurales y de comportamiento) identificándose el estadio de desarrollo. Además, se tomaron medidas de los gametos y larvas.

Fué estimado el efecto del uso de antibióticos, utilizando sulfametazine (original y duplicado) en concentraciones de 25, 50, 100 y 200 partes por millón (ppM). Para ésto, se colocaron 3000 larvas en cristalizadores con un volumen de 2 litros de AMF ($5\mu\text{m}$) e irradiada con luz (UV). Se estimó la sobrevivencia diariamente realizando 3 conteos de los organismos presentes en cada concentración mediante muestreos con reemplazo en un volumen de 10 ml.

3.3 Tratamiento estadístico

Se comparó el efecto de las diferentes concentraciones de sulfametazine al tercer día en virtud de ser el tiempo al cual la larva ha terminado su desarrollo previo a la

metamorfosis. Se aplicó a los datos la prueba de normalidad por Kolmogorov-Smirnoff y homogeneidad de varianzas por Cochran, resultando $P > 0.05$ por lo cual se prosiguió con un análisis de varianza (ANOVA) de 3 vías (balanceado) modelo I (de efectos fijos). En los casos en que la $P < 0.05$ se realizó una prueba a posteriori de comparación múltiple por Tukey para investigar cuál o cuales medias eran diferentes. Las pruebas de normalidad y ANOVA se corrieron en un microcomputador (compatible IBM) utilizando el software "STATGRAPHICS". La prueba de homogeneidad de varianzas y la prueba a posteriori de comparación múltiple por Tukey se hicieron manualmente (Zar, 1984).

Se continuó con el experimento hasta el octavo día de desarrollo, para conocer el efecto de la falta de sustrato para el asentamiento sobre la sobrevivencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Aspectos generales

Las características del desarrollo embrionario y larval en función del tiempo, del caracol marino Astraea undosa, están descritas en la tabla I. Lo anterior en condiciones de laboratorio y temperatura de 21.6 °C promedio ($\bar{I}=0.5$) a partir del tiempo de fertilización. Estos resultados corresponden a tres eventos separados de desarrollo embrionario y larval. La temperatura utilizada (21.6 °C) es semejante a la que se presenta en el medio natural durante la época de desoves y desarrollo larval (Ramade, 1989). En la tabla II están descritos los tiempos en que aparecieron los estadios de desarrollo embrionario y larval de A. undosa a 17.5 °C promedio ($\bar{I}=1$), temperatura diferente a la cual se desarrolla en el medio natural.

En el desarrollo embrionario y larval de Astraea undosa aparecieron los estadios típicos de los moluscos gasterópodos, arqueogasterópodos. Comparándolo con el desarrollo de Trochus niloticus es muy semejante (Heslinga, 1981), solo varía en los tiempos de aparición de los estadios, siendo los de A. undosa más largos.

El tamaño medido de los huevos de A. undosa fue de 209 μm de diámetro promedio ($\bar{I}=15\mu\text{m}$), mas grandes que los de Trochus niloticus, los cuales miden 185 μm , según lo

Tabla I. Tiempo en que se presentaron las principales características y estadios del desarrollo embrionario y larval del caracol *Astraea undosa*, a 21.6 ± 0.5 grados centígrados y condiciones de laboratorio.

Estadio de Desarrollo	Tiempo postfertilización	Tamaño $\bar{x} \pm s$	Características Morfológicas	
E M B R I O L O G I C O	1ra. División	5 a 9 min.	209 ± 15 μ m	Aparición de dos células (blastómeros).
	2da. División	14 a 18 min.		Aparición de cuatro células.
	3ra. División	20 a 30 min.		Aparición de ocho células.
	4ta. División	35 a 45 min.		Aparición de 16 células.
	Morula	3:01 a 3:45 h.		Forma esférica de los blastómeros (multicelular).
	Gástrula	4:14 a 5:29 h.		Multicelular, con esbozo de los cilios mostrando movimiento vibratorio.
	Trocófora joven (preeclusión)	5:00 a 6:56 h.		Presencia de la prototroca (corona de cilios), el movimiento ciliar es mas intenso.
L A R V A	Trocófora joven (eclosionada)	7:30 a 9:00 h.	L-201 ± 5 μ m A-176 ± 2 μ m c-42 ± 1 μ m	Corona ciliar con movimientos contráctiles y retráctiles y la presencia del penacho prototrocal (cilios apicales). La corona ciliar muestra coloración verde esmeralda. Se inicia la formación de la protoconcha. Corona ciliar y cilios apicales completamente formados. Presentan movimiento giratorio en sentido contrario a las manecillas del reloj. Protoconcha mas desarrollada
	Trocófora avanzada	13:00 a 15:40 h.		Concha bien formada. Aparece el pié rudimentario con capacidad de retracción notable. Presenta movimientos movimientos de nado libre, mediante la agitación circular de los cilios de la corona. Aparecen los músculos retractores de la concha.
	Véliger joven	17:40 a 19:40 h.	L-277 ± 4 μ m A-205 ± 3 μ m c-35 ± 1 μ m	Pié completamente formado. Opérculo visible incipiente. Músculos retractores completamente desarrollados.
	Véliger avanzada	25:00 a 26:30 h.		Aparecen las manchas oculares y el Opérculo bien formado. Corona ciliar plegada hacia el centro de la corona. Brotan los tentáculos cefálicos. Aparecen cilios sobre el pié.
	* 32:04 a 36:08 h.	L-300 ± 8 μ m A-210 ± 3 μ m c-20 ± 1 μ m		Tentáculos cefálicos con dos ramificaciones visibles. Manchas oculares mejor desarrolladas. 80% sin prototroca.
	* 37:00 a 39:00 h.			Aparecen tres ramificaciones en los tentáculos cefálicos. Se pierde la prototroca 100%.
	* 68:30 a 83:00 h.	L-300 ± 8 μ m A-210 ± 3 μ m		
	* 95:00 a 103:00 h.	L-300 ± 8 μ m A-220 ± 5 μ m		

L-longitud mayor del organismo.

A-lado mas ancho de la concha del organismo.

c-longitud de los cilios.

X-promedio de mediciones en tres corridas de larvas.

s-desviación estandar de las mediciones.

* tiempo en que aparecen las características.

Tabla II. Tiempo en que se presentaron los estadios del desarrollo embrionario y larval del caracol *Astraea undosa*, a 17 \pm 1 grados centígrados en condiciones de laboratorio.

Estadio de Desarrollo	*Tiempo promedio postfertilización	Características Morfológicas
1ra. División	0:58 a 1:08 h.	Aparición de dos blastómeros (células).
2da. División	1:49 a 2:03 h.	Aparición de 4 células.
3ra. División	2:30 a 2:40 h.	Aparición de 8 células.
4ta. División	3:03 a 3:21 h.	Aparición de 16 células.
Morula	3:45 a 4:13 h.	Forma esférica de los blastómeros (multicelular)
Gástrula	9:00 a 9:30 h.	Multicelular, con pequeños cilios móviles.
Trocófora joven (eclosionada)	18:33 a 21:37 h.	Corona ciliar y penacho prototrocal (cilios apicales). Se inicia la formación de la protoconcha, posee nado libre.
Trocófora avanzada	23:05 a 25:45 h.	Presentan movimientos natatorios circulares en sentido contrario a las manecillas del reloj. Protoconcha mejor desarrollada. Prototroca y ribete prototrocal completamente formados.
Véliger	33:05 a 37:25 h.	Aparecen los músculos retractores de la concha. Aparición del pie y opérculo con movimiento retráctil. Aparición de la mancha ocular y el primer esbozo de los tentáculos cefálicos.

* (Tiempo promedio de dos corridas de larvas).

reportado por Heslinga, (1981). El espermatozoide tiene una longitud total promedio de $56\mu\text{m}$ ($\bar{I}=2\mu\text{m}$), la cabeza midió $7\mu\text{m}$ ($\bar{I}=0.5\mu\text{m}$) de los cuales $2\mu\text{m}$ corresponden al acrómero y $49\mu\text{m}$ al flagelo.

De la tabla I es sobresaliente el tiempo en que sucedió el desarrollo embrionario el cual tuvo una duración de 5 a 6:56 horas. Para el caracol Trochus niloticus el tiempo es de aproximadamente 8 h (Heslinga, 1981), mas largo que el de Astraea undosa. La eclosión en términos generales, ocurrió entre 7:30 y 9 horas después de la fertilización. Durante el tiempo de desarrollo larval no fué necesario aportar alimento, al igual que para T. niloticus.

Hasta el momento en que suceda el asentamiento se deberá proporcionar alimento, pues es el momento en que se hace funcional el tracto digestivo, como acontece en larvas de los abulones (com. pers. Oc. Robero Flores Aguilar).

4.2 Descripción del desarrollo embrionario.

La fecundación ocurrió aproximadamente a los cinco minutos después de la mezcla de espermatozoides y óvulos. Se observó que al aumentar la concentración de espermatozoides

(Oc. Roberto Flores Aguilar, Delegación Federal de Pesca en Ensenada, Baja California).

por encima de 200 por óvulo, durante la fertilización, la formación de embriones deformes fué abundante, ya que se presentó poliespermia.

Entre los tres y siete minutos después de llevada acabo la fertilización apareció el cuerpo polar (figura 2a), observable en el espacio perivitelino del huevo.

Cuando sucedió la primera segmentación del huevo se observó muy poco líquido citoplasmático entre el huevo y la membrana.

La primera división del huevo (figura 2b) ocurrió de cinco a nueve minutos después de la fertilización formando dos blastómeros iguales.

La segunda división (figura 2c) se produjo entre los 14 y 18 minutos, posteriores a la fertilización, se vió una segmentación perpendicular a la anterior dando lugar a cuatro blastómeros iguales.

La tercera segmentación (figura 2d) surgió entre los 20 a 30 minutos después de la fertilización. Aquí se formaron ocho blastómeros de los cuales los cuatro del polo animal son más pequeños (micrómeros) que los del polo vegetativo (macrómeros). Este tipo de segmentación fue en espiral ya que los micrómeros se acomodaron entre cada dos macrómeros.

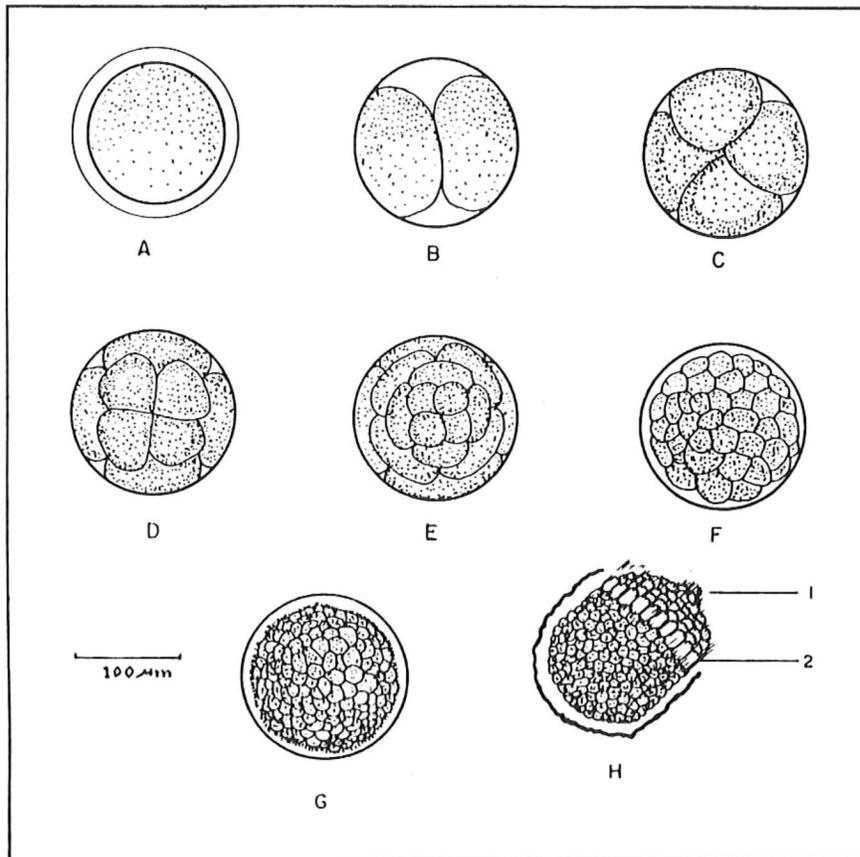


FIG. 2 - PRINCIPALES CARACTERISTICAS Y ESTRUCTURAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIOLOGICO DEL CARACOL MARINO *Astroea undosa* : A) APARICION DEL CUERPO POLAR , B) PRIMERA DIVISION EN 2 CELULAS , C) SEGUNDA DIVISION EN 4 CELULAS , D) TERCERA DIVISION EN 8 CELULAS , E) CUARTA DIVISION EN 16 CELULAS , F) MORULA , MULTICELULAR , G) GASTRULA , CON CILIOS INCIPIENTES , MOVILES , H) TROCOFORA JOVEN, AL MOMENTO DE ECLOSION, AUN ENVUELTA EN LA MEMBRANA, POSEE : 1. penocho apical , 2. corona ciliar con gran movilidad.

La cuarta división (figura 2e) se manifestó entre los 35 y 45 minutos después de la fertilización. Aquí los macrómeros generaron otras cuatro células (nuevos micrómeros) y los micrómeros dieron origen cada uno a otra célula de menor tamaño, presentándose así 16 células en total.

Después de repetidas divisiones, el conjunto de blastómeros tomó forma esférica formándose el estado de mórula (figura 2f).

La gastrulación (figura 2g) ocurrió entre las 4:14 a 5:29 horas después de la fertilización presentando pequeños cilios con movimiento vibratorio dentro de la membrana del huevo. Para Trochus niloticus esto ocurre entre las 5 y 6 h (Heslinga y Hillmann, 1981).

Entre las 5 a 6:56 horas se observó la larva trocófora joven dentro de la membrana, con la prototroca (corona de cilios) y un penacho apical que le permitía realizar movimientos dentro de la membrana. En el desarrollo de Trochus niloticus esta se presenta a las 12 h (Heslinga y Hillmann, 1981). La larva trocófora permaneció así por algún tiempo hasta que entre las 7:30 a 9 h inició giros dentro de la membrana y el roce de los cilios sobre las paredes de la membrana provocó el rompimiento de ésta. Por la hendidura formada eclosionó (figura 2h).

4.3 Descripción del desarrollo larval.

En la figura 3 se muestran las características y estructuras del desarrollo larval de Astraea undosa hasta el momento en que aparecieron los organelos típicos previos al asentamiento, aproximadamente a las 75 horas promedio ($\bar{x}=7:15h$) después de la fertilización y temperatura promedio de $21.6^{\circ}C$ ($\bar{x}=0.5$).

La larva trocófora es el primer estadio libre que tienen los moluscos gastrópodos, (Peña,1983). En Astraea undosa la larva trocófora eclosionada midió en promedio: $201\mu m$ ($\bar{x}=5\mu m$) de longitud, $176\mu m$ ($\bar{x}=2\mu m$) de ancho y $42\mu m$ ($\bar{x}=1\mu m$) de longitud ciliar. Al eclosionar tenía una corona de cilios llamada prototroca la cual era de coloración verde esmeralda y un penacho apical, que en otras especies interviene en procesos de alimentación y de movimiento.

En la figura 3B se distingue la formación de la protoconcha en el extremo dorsal posterior de la larva trocófora joven de Astraea undosa, la cual se hizo notoria aproximadamente a las 8:15 horas. En Trochus niloticus la protoconcha se presenta hasta las 13:00 horas (Heslinga y Hillmann, 1981).

La larva trocófora avanzada se presentó entre las 13 y 15 h. En este estadio la prototroca ciliar y ribete apical estaban completamente formados. El movimiento de la larva era giratorio en sentido contrario a las manecillas del

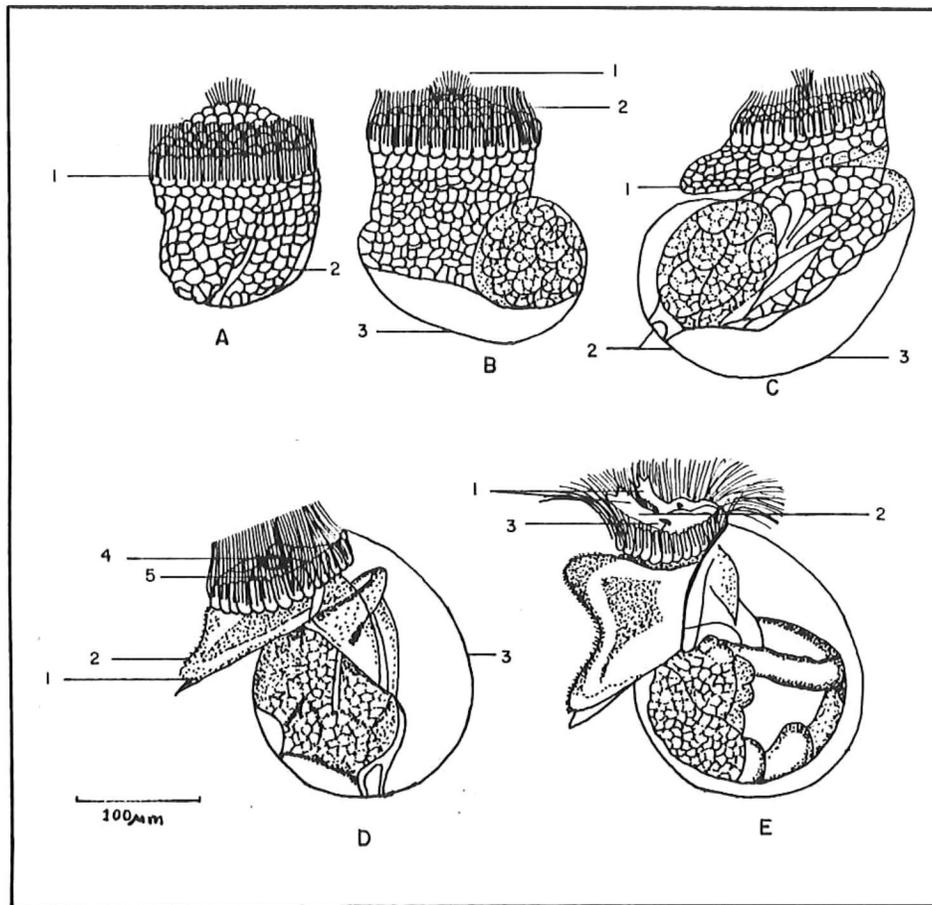


FIG. 3 - PRINCIPALES CARACTERISTICAS Y ESTRUCTURAS DURANTE EL DESARROLLO LARVAL DEL CARACOL MARINO *Astraea undosa* :

A) TROCOFORA JOVEN RECIEN ECLOSIONADA, 1. el anillo prototroco aparece mejor desarrollado . 2. se inicia la formación de la protoconcha.

B) LARVA TROCOFORA JOVEN PRESENTA: 1. penacho apical , 2. corona ciliar mas desarrollada , 3. continua el desarrollo de la protoconcha.

C) LARVA TROCOFORA AVANZADA PRESENTA : 1. desarrollo del pie , 2. músculos retractores de la concha , 3. concha mejor desarrollada ,

D) LARVA VELIGER JOVEN PRESENTA: 1. pie completamente formado, 2. cilios alrededor del pie , 3. opérculo , 4. protuberancias de los tentáculos cefálicos y aparecen 5 las manchas oculares.

E) LARVA VELIGER COMPLETAMENTE FORMADA, APARECEN: 1. tres ramificaciones en los tentáculos cefálicos , 2. mayor longitud de los tentáculos cefálicos y 3. ojos completamente visibles .

reloj utilizando los cilios. La protoconcha estaba mejor desarrollada.

La larva véliger joven surgió entre las 17:40 y 19:40 h (figura 3C), la protoconcha creció progresivamente rodeando al organismo por la parte dorsal posterior. Aquí, la larva presentó un pie rudimentario con la capacidad de retracción notable. La larva mostró nado libre y activo cambiando de lugar, subiendo y bajando en la columna de agua mediante la agitación circular de los cilios de la prototroca. Aparecieron los músculos retractores de la concha. En estos momentos la larva midió en promedio: $277\mu\text{m}$ ($\dot{I}=4\mu\text{m}$) de longitud, $205\mu\text{m}$ ($\dot{I}=3\mu\text{m}$) de ancho y $35\mu\text{m}$ ($\dot{I}=2\mu\text{m}$) de longitud de los cilios.

Entre las 25 y 26:30 horas se presentó la larva véliger avanzada donde ya observó el pie completamente formado y empezó a distinguirse el opérculo. Los músculos retractores de la concha estaban completamente desarrollados y el organismo ya podía retraerse dentro de la concha. En este estadio las larvas tenían fototactismo negativo al ponerlas frente a la luz. Trochus niloticus se retrae dentro de su concha a las 24 horas y también presenta fototactismo negativo (Heslinga, 1981).

A las 32:04 a 36:08 horas la larva véliger midió en promedio: $300\mu\text{m}$ ($\dot{I}=8\mu\text{m}$) de longitud, $210\mu\text{m}$ ($\dot{I}=3\mu\text{m}$) de ancho. Los cilios midieron $20\mu\text{m}$ ($\dot{I}=1\mu\text{m}$), siendo menores que en la larva véliger joven, ya que se inclinan hacia el centro de

la corona ciliar. El opérculo estaba completamente formado y en la parte central se distinguieron las manchas oculares (estigmas oculares). Poco tiempo después surgieron pequeños cilios en el pie y apareció un esbozo de los tentáculos cefálicos (figura 3D).

A las 68:30 a 83:00 horas la larva véliger ya estaba completamente desarrollada (figura 3E), se le veían dos ramificaciones de los tentáculos cefálicos. El movimiento del pie era lateral y hacia abajo, lo cual se considera indicador del asentamiento en otras larvas (com.pers. Oc.Roberto Flores Aguilar).

Entre las 95:00 a 103:00 horas, posteriores a la eclosión, las larvas de Astraea undosa, ya poseían tres ramificaciones en los tentáculos cefálicos y aproximadamente el 80% perdieron los cilios de la prototroca (corona ciliar). En este tiempo la larva midió en promedio: $300\mu\text{m}$ ($\bar{I}=8\mu\text{m}$) de longitud y $220\mu\text{m}$ ($\bar{I}=5\mu\text{m}$) de ancho. El caracol Trochus niloticus pierde los cilios a las 70 h (Heslinga, 1981) y mide $289.1 \pm 7.3\mu\text{m}$ (Heslinga y Hillmann, 1981).

La duración total del tiempo de desarrollo embrionario y larval en condiciones de laboratorio y temperatura de $21.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ fué de aproximadamente 4 días. Considerando que las larvas son pelágicas y que los desoves suceden cuando la temperatura superficial alcanza los $20-21^\circ\text{C}$, es muy probable que los asentamientos en el medio sucedan dentro de los primeros cuatro días posteriores a la fertilización.

Durante el desarrollo embrionario y larval de Astraea undosa en 17 °C (Í=1) (Tabla II) sucedieron los estadios de desarrollo más lentamente que a 21.6 °C (Í0.5) (Tabla I). Por ejemplo: la primera división se presentó entre los 0:58 y 1:08 h, mientras que en la temperatura mayor ocurrió entre los 5 y 9 minutos. En la gástrula se duplicó el tiempo de 4 a 9 horas aproximadamente. La trocófora joven (eclosionada) tardó el doble de tiempo en aparecer, de 7 a 18 horas. La larva véliger demoró en aparecer aproximadamente de 17 a 33 horas, casi el doble de tiempo. Esto indica que la temperatura influye en el tiempo del desarrollo. Dado que Astraea undosa se reproduce en verano, cuando la temperatura superficial alcanza 20 °C (Ramade, 1989), se considera que el A. undosa alcanza un mejor desarrollo en laboratorio en temperatura similar a la que se reproduce en el medio natural.

4.4 Uso de antibiótico

El efecto de la concentración del antibiótico sulfametazine sobre la sobrevivencia durante el desarrollo larval de Astraea undosa se presentan en la figura 4.

El tiempo que duró este experimento excedió al del desarrollo larval completo, ya que se continuó hasta el octavo día en que los organismos murieron. Las estructuras típicas que indicaron el momento del asentamiento

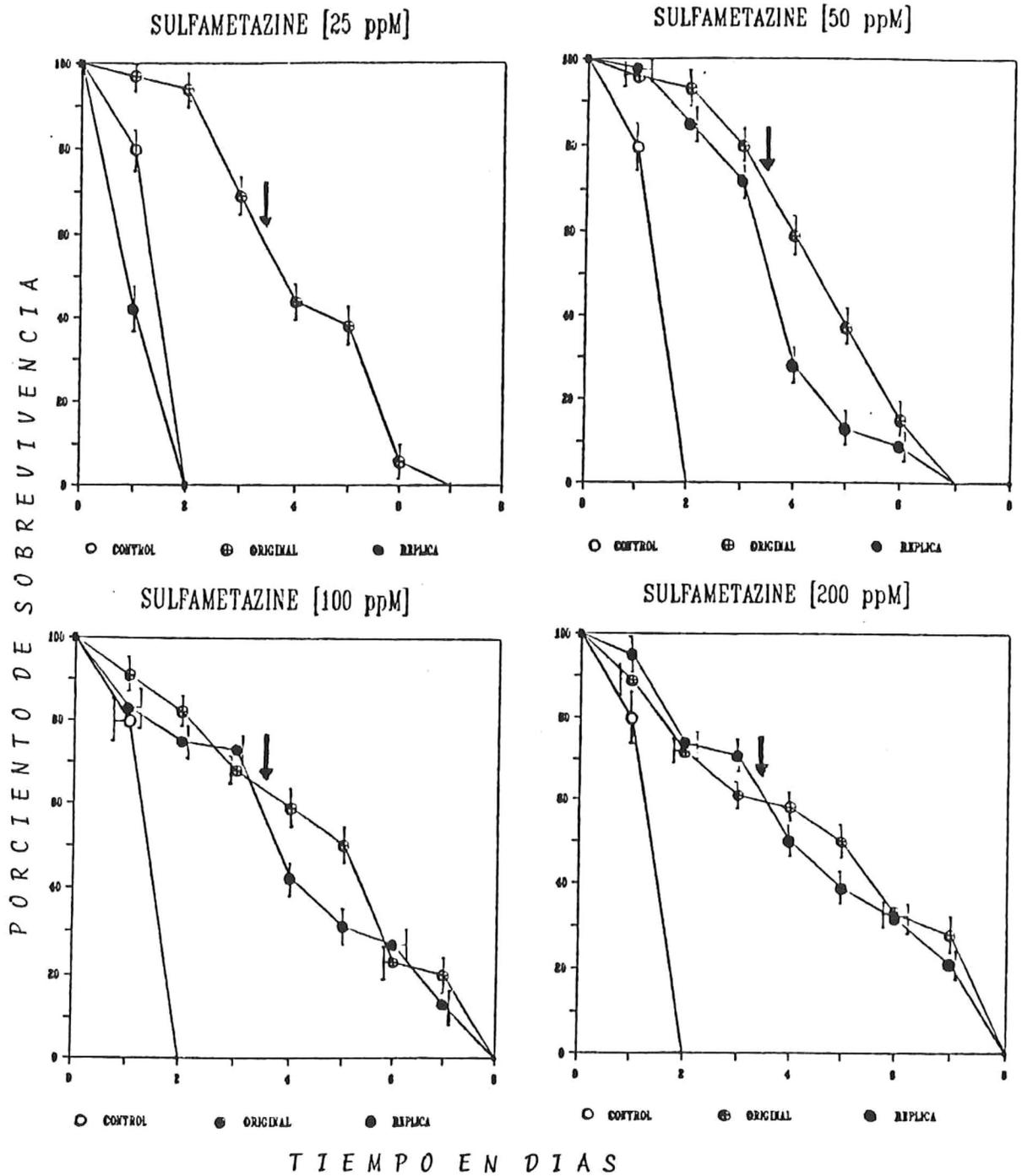


Figura 4.- Efecto de la concentración de Antibiótico (Sulfametazina) en el desarrollo larval de *Astraea undosa*, en 21.5°C. Las barras verticales representan la desviación estandar. La flecha indica el momento que aparecen las estructuras típicas previas a la metamorfosis.

aparecieron a las 75 horas aproximadamente (alrededor de 3.5 días).

El porcentaje de sobrevivencia al final del tercer día (figura 4) fué de 70% en todas las concentraciones, encontrándose diferencia significativa ($P > 0.05$) entre estos. Sin embargo conforme aumentó la concentración la curva decayó más rápido en las concentraciones de 100 y 200ppM respecto a las de 25 y 50ppM. Un valor de sobrevivencia ligeramente mayor, que en los otros tratamientos, se presentó en la concentración de 50ppM. En el control (sin antibiótico) la sobrevivencia de las larvas fué de 0% al segundo día.

A excepción de un duplicado, en la concentración de 25ppM, en que la sobrevivencia fué menor que el control (sin antibiótico), en todas las demás siempre existió marcada diferencia entre el desarrollo larval sin antibiótico (control) y el que contenía sulfametazine.

En las primeras concentraciones (25 y 50ppM) al séptimo día se presentó una sobrevivencia de 0%, en tanto que en las segundas (100 y 200ppM) hasta el octavo día, surgió en la gran mayoría deformaciones y muchas permanecieron dentro de la concha.

El uso de antibióticos en acuicultura se maneja durante el desarrollo larval en los invertebrados, (Smith y Chanley, 1975). Sin embargo cualquier antibiótico debe ser probado

antes de ser utilizado. Astraea undosa denotó buenos resultados con el antibiótico sulfametazine en el rango de 25 a 200 ppM. No obstante que en la prueba estadística ANOVA marcó diferencia significativa ($P > 0.05$) debida a la concentración (entre 50, 100 y 200ppM) y al tiempo (Tabla III). Para saber cuales medias fueron diferentes se hizo la prueba a posteriori por Tukey (manualmente), resultando que debido a la concentración todas las medias son diferentes, respecto al tiempo solo las medias de los días 1 y 2 son semejantes y en original y replica las medias son iguales.

Para efectos prácticos, como lo es la acuicultura, los valores obtenidos de sobrevivencia de 70 al 80 %, en las diferentes concentraciones (previos al momento del asentamiento) nos indican que pueden ser utilizadas indistintamente. Es notable que en todas las concentraciones se presentó un comportamiento semejante, por lo que se considera que el antibiótico utilizado no tuvo un efecto adverso en la sobrevivencia de las larvas de Astraea undosa, ya que el valor promedio se mantuvo en un 70% en todas las concentraciones.

Se considera que la sobrevivencia observada al tercer día es homogénea en las cuatro concentraciones utilizadas (25, 50, 100 y 200 ppM), manteniéndose aproximadamente en un 75% entre el tercer y cuarto día. Este valor fué disminuyendo en los días siguientes, debido a la falta de un

Tabla III.- Análisis de varianza de tres vías de los datos del efecto de la concentración (CONC), tiempo (TPO) y original y replica (ORRE) sobre la sobrevivencia de larvas de Astraea undosa, a 21.5 °C. (5% de significancia).

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	grados de libertad	Media Cuadrática	F	Nivel de signific.
Efectos					
Principales	699.291	6	116.548	52.54	
CONC	408.791	2	204.395	92.15	*
TPO	278.500	3	92.833	42.85	*
ORRE	12.000	1	12.000	5.41	NS
Interacciones de dos factores					
	141.833	11	12.893	5.813	
CONC X TPO	8.875	6	1.479	0.667	NS
CONC X ORRE	129.125	2	64.562	29.108	*
TPO X ORRE	3.833	3	1.277	0.576	NS
Residual	66.541	30	2.218		
Total	907.666	47			

* significativo

NS no significativo

sustrato adecuado para el asentamiento. Por lo tanto la disminución en el porcentaje de sobrevivencia de los días cuatro en adelante es atribuible a la falta de un sustrato y no al efecto del antibiótico. Aunque no es posible encontrar una explicación para lo que se presentó en las concentraciones de 100 y 200 ppM, ya que la sobrevivencia se mantuvo alrededor del 20% en el séptimo día y hasta el octavo día fué de 0% .

A una mayor concentración de antibiótico fué menor la presencia de microorganismos, además tuvieron cambios diarios de agua, lo que también quitó la posibilidad de algún tipo de sustrato.

Sin la ayuda de antibiótico (control) las larvas no alcanzaron la etapa de desarrollo larval completa, ya que murieron al segundo día, muy posiblemente debido a la baja calidad del agua a pesar de haber sido filtrada (5 μm) e irradiada con luz UV, por lo que se considera que este fué otro factor experimental. Si este factor no hubiera estado (calidad de agua) la sobrevivencia con antibiótico debió haber alcanzado mayores porcentajes de sobrevivencia que los obtenidos al tercer día.

5. CONCLUSIONES

La vida embriológica y larval pelágica de Astraea undosa criada en laboratorio a 21.6 ± 0.5 °C y salinidad de 35ppm fué de cuatro días.

La larva trocófora aparece a las 8:15 horas \pm 45 minutos posterior a la fertilización y mide 201 μm promedio ($\bar{I}=5$ μm) de longitud (sin cilios), 176 μm promedio ($\bar{I}=2$ μm) de ancho y 42 μm promedio ($\bar{I}=1$ μm) de longitud ciliar.

La larva véliger apareció a las 18:40 horas \pm 60 minutos posterior a la fertilización y midió en promedio 277 μm de longitud, 205 μm de ancho y 35 μm de longitud ciliar.

En temperatura de 17.5 °C el tiempo de aparición de la larva véliger se prolonga a 35:00 \pm 2:10 horas posterior a la fertilización.

En el estadio de larva véliger avanzada, estas presentan fototactismo negativo.

La larva de Astraea undosa no requirió de alimentación exógena durante su desarrollo embrionario y larval.

El uso del antibiótico (sulfametazine) en las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 ppM, no presentó influencia desfavorable sobre el desarrollo larval de Astraea undosa, por lo que se recomienda su aplicación.

6. LITERATURA CITADA

Barnes, R.D. 1977. Zoología de Invertebrados. Ed. Interamericana, S.A.C.V. México. 826pp.

Becerril Bobadilla, F.J.U. 1988. Distribución y abundancia del caracol Astraea undosa (Wood, 1928) (Mollusca: Gasterópoda) en la Bahía de Todos Santos de Mayo a Octubre de 1987. Tesis de Licenciatura. UABC. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C. 48pp.

Giese, A.C. and J.S. Pearse. 1977. Reproduction of Marine Invertebrates. In: Molluscs: Gasteropods and Cephalopods, vol IV. Academic Press. New York. 369pp.

Haro-Vera, V. 1975. Atlas de Zoología. Ediciones Jover, S.A. Barcelona. 86pp.

Heslinga, G.A. 1981. Larval Development, Settlement and Metamorphosis of the Tropical Gastropod Trochus niloticus. Malacologia. 20(2): 349-357.

Heslinga, G.A. and Hillmann, A. 1981. Hatchery Culture of the Comercial Top Snail Trochus niloticus in Palau, Caroline Islands. Aquaculture. 22: 35-43.

Ibarra-Preisser A. 1990. Uso de estímulos biológicos, físicos y químicos para promover la expulsión de gametos en el caracol marino Astraea undosa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B.C. 22 pp.

Mason, J. 1971. Mussel Cultivation. Underwater journal and information, bulletin 3(2): 125-129.

Morrison, R.H., D.P. Abbott and E.C. Handerlie. 1980. Intertidal Invertebrates of California. Stanford University Press. Stanford, California. 378 pp.

Peña, J. B., 1983. Desarrollo embrionario de Haliotis discus Reeve (Mollusca: Gastropoda, Prosobranquia). Instituto de Acuicultura de Torre de Sal Ribera de Cabanes. Castellón. Inv. Pesq. 48(3): 441-454.

Ramade, V.M.R. 1989. Efecto el tamaño corporal, temperatura y sexo sobre la tasa metabólica del caracol Astraea undosa (Mollusca: Gasterópoda) en condiciones de invierno. Tesis de Licenciatura. UABC. Fac. de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C. 47pp.

Raven, C.P. 1966. Development. In: Physiology of Mollusca, Vol I. eds. Wilburn, K.M. and C.M. Yonge. Academic Press, New York. 473pp.

Sastry, A.N. 1964. The development and external morphology of pelagic larval and post-larval stages of the bay scallop, Aequipecten irradians concentricus Say, reared in the laboratory. Bull. Mar. Sci. 15(2): 417-435.

Smith, W.L. and M.H. Chanley. 1975. Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press. New York. 286pp.

Zar, J. H., 1984. Biostatistical Analysis. 2nd Ed. Prentice-Hall. USA. 358pp.