

Desarrollo embrionario y larval de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en condiciones de laboratorio en la Isla de Margarita-Venezuela

Olga Gómez M.¹ & Alfredo Gómez G.²

1 Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Oriente, Boca del Río - Nueva Esparta, Venezuela; Telefax: 0295 2913150; ogomez@udo.edu.ve

2 Museo Marino de Margarita; Telefax: 0295 2913132; mara@udo.edu.ve

Recibido 14-VI-2004. Corregido 09-XII-2004. Aceptado 17-V-2005.

Abstract: Embryonic and larval development of *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) in laboratory conditions at Isla de Margarita-Venezuela. The sea urchin *Lytechinus variegatus* is a promissory species for aquaculture activities in tropical countries. In Venezuela, this species has some economical importance but their embryonic and larval development had not been studied. We collected specimens from seagrass beds in Margarita Island (Venezuela) and kept them in the laboratory, where they spawned naturally. With filtered sea water (temperature 28°C, salinity 37 psu) and moderate aeration, the eggs and sperm were mixed (relation 1:100) and reached a 90% fertilization rate. The fertilization envelope was observed after two minutes, the first cellular division after 45 minutes and the prism larval stage after 13 hours. The echinopluteus larval stage was reached after 17 hours and metamorphosis after 18 days of planktonic life, when the larvae start their benthic phase. Rev. Biol. Trop. 53(Suppl. 3): 313-318. Epub 2006 Jan 30.

Key words: Sea urchins, *Lytechinus variegatus*, larvae, larval development, culture, echinoid, echinoderms.

Los erizos tienen gran importancia económica porque sus gónadas se consideran exquisitas y son altamente apreciadas en algunos países europeos, en América del Sur y Asia. *Lytechinus variegatus* (Lamarck) es la especie de erizo de mayor abundancia en la Isla de Margarita en el nororiente de Venezuela, donde puede alcanzar un diámetro de testa de 90 mm y hasta 150 g de peso. Este organismo es muy común en las praderas de fanerógamas (*Thalassia testudinum*), en fondos con profundidades menores a 20 m (Gómez 1999). En Venezuela, las gónadas se comercializan de manera informal preparadas artesanalmente en formas de cono en su concha, alcanzando un precio de hasta US \$ 1 por cono de erizo (Gómez 1999). En el caso de ocurrir una explotación intensiva de *L. variegatus*, se tiene el riesgo de agotar sus bancos naturales, como

ha ocurrido en otros países. La especie tiene un rápido crecimiento, madura sus gónadas en corto periodo de tiempo y por la facilidad de mantenerlos en cautiverio, se considera un candidato potencial para la acuicultura (Hugh *et al.* 2001, Wallace *et al.* 2001). Teniendo en cuenta la explotación que se hace del recurso, el presente trabajo estudia su desarrollo embrionario y larval con miras a desarrollar futuras técnicas para el cultivo semicontrolado y la repoblación natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los erizos *L. variegatus* fueron recolectados mensualmente por buceo en la Isla de Cubagua. En el laboratorio los ejemplares sexualmente maduros, se lavaron con agua de mar filtrada y

se dejaron al aire libre hasta ocurrir el desove natural, esto fue aproximadamente tres horas después de la captura. Al iniciar el desove, los óvulos contados en cámara de Bogorov y los espermatozoides contados en cámara Neubauer, fueron depositados en vasos de precipitado de 1 l, conteniendo 500 ml de agua de mar filtrada. Los gametos fueron medidos con micrómetro ocular, lo cual también fue útil para determinar la abertura de malla utilizada para la limpieza de los huevos.

En el recipiente que contenía los óvulos fueron agregados los espermatozoides, manteniendo una proporción de aproximadamente un óvulo por cada 100 espermatozoides. Después de la fecundación, los huevos fueron lavados tres veces con agua de mar filtrada, en un tamiz de 80 μm , para eliminar materia orgánica y el exceso de espermatozoides. Luego del lavado, los huevos fueron incubados en agua de mar filtrada (temperatura de 28 ± 2 °C y salinidad 37 psu) y observados al microscopio para determinar el tiempo de división celular (2, 4, 8, 16, 32 y 64 células) y los estadios de blástula y gástrula.

Para el desarrollo larval se utilizaron tres recipientes de vidrio transparente, provistos con 6 l de agua de mar filtrada y aireación continua. La densidad de siembra fue de 5 larvas/ml. Cuando las larvas llegaron a la fase de prisma fueron monitoreadas diariamente hasta que ocurrió la metamorfosis. La descripción de los brazos se realizó siguiendo la nomenclatura referida por Mc Edward y Herrera (1999): PO, postoral; ALA, anterolateral; PD, posterodorsal; PR, Preoral, y las medidas del cuerpo y brazos según lo señalado por Maeve *et al.* (2000). Para el monitoreo se extrajeron cinco larvas que se fijaron con formalina (0.5%) y se midieron empleando un micrómetro ocular. Las larvas fueron alimentadas con las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis* sp. y *Tetraselmis chunii*, suministradas en una concentración de 2×10^4 cel/ml, manteniendo una relación 1:1:2. Diariamente se cambió el 85% del agua de los cultivos, utilizando un tamiz de 65 μm . Una vez alcanzado el estadio de competencia se procedió a cosechar todas las

larvas y transferirlas a otro acuario para inducir la fijación de la larva al sustrato, para lo cual se usaron laminillas de asbesto sobre un fondo arenoso; en esta fase como alimento se suministró la macroalga *Ulva lactuca* y las especies de microalgas mencionadas.

RESULTADOS

Los óvulos maduros del erizo *L. variegatus* tuvieron un diámetro medio de 119 ± 2 μm y los espermatozoides tienen una longitud de $5 \pm 1 \times 1.5$ μm de ancho. Con una relación óvulos: espermatozoides de 1:100 se obtuvo un porcentaje de fecundación del 90%. La fecundación ocurrió después de dos a tres minutos de realizada la mezcla de los gametos y se determinó por la formación de una membrana cristalina (membrana de fecundación) alrededor del óvulo (Fig. 1). La primera división celular (dos blastómeros) ocurrió a los 45 minutos de la fertilización (Fig. 2a) y la formación de 64 células se determinó a los 170 minutos (Fig. 2b). Cada vez que ocurría una división celular los blastómeros resultantes eran de menor tamaño. Las fases de blástula y gástrula fueron observadas a los 250 y 565 minutos después de la fertilización; el estado de prisma (Fig. 3) ocurrió a los 780 min (13 h), en esta fase la larva tuvo una longitud de 140 ± 2 μm .



Fig. 1. Membrana de fertilización (40x).

Fig. 1. Fertilization membrane (40x).

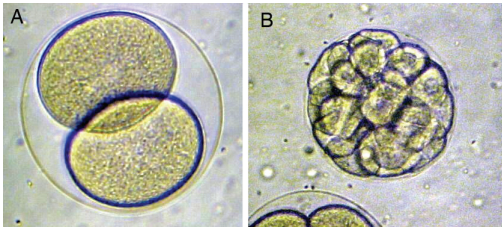


Fig. 2. a. Primera división: dos células; b. estadio de 64 células (40x).

Fig. 2. a. First division: two cellules; b. 64 cellules stage (40x).

A los 1027 minutos de la fertilización (17 h), se observó la larva minúscula pluteus temprana, con una longitud de $182 \pm 1 \mu\text{m}$, un par de brazos (brazos PO) y los esbozos de otras prolongaciones (brazos ALA). Durante esta fase (estadio de dos brazos), la larva tuvo un movimiento rotatorio y su coloración es igual a la del alimento que ingirió. Aproximadamente a las 72 horas de la fertilización el movimiento de la larva disminuyó y el cuerpo alcanzó una longitud de $280 \pm 1 \mu\text{m}$ y presentaba dos pares de brazos que midieron $364 \pm 2 \mu\text{m}$ (estadio de cuatro brazos) (Fig. 4). Al octavo día de desarrollo (Fig. 5), el cuerpo midió $400 \pm 2 \mu\text{m}$, y se observan cuatro pares de brazos (brazos: PO, ALA, PD y PR) los cuales tienen una longitud máxima de $580 \pm 3 \mu\text{m}$ (estadio de ocho brazos).

Al décimo día de vida la larva reabsorbe todos sus brazos, pero el cuerpo continúa desarrollándose hasta medir $425 \pm 3 \mu\text{m}$. Se aprecia

una relación inversa entre el crecimiento del cuerpo y las prolongaciones, las cuales miden $364 \pm 2 \mu\text{m}$ (Cuadro 1). Entre los 10 y 12 días del desarrollo, aproximadamente el 80% de las larvas se desplazan hacia el fondo del recipiente de cultivo. Además se observó la formación de los pies ambulacrales (Fig. 6). A los 18 días de la fertilización ocurrió la metamorfosis de la larva pluteus a juvenil, la cual tuvo un diámetro de $450 \mu\text{m}$ (0.45 mm) y sobre el cuerpo se observaron espinas pequeñas.

DISCUSIÓN

En este estudio, los óvulos maduros de *L. variegatus* tuvieron un diámetro de $119 \pm 2 \mu\text{m}$, valor ligeramente superior a los reportados por

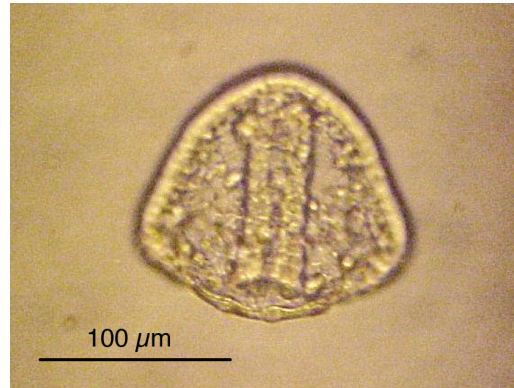


Fig. 3. Estadio de prisma (40x).

Fig. 3. Prisma stage (40x).



Fig. 4. Larva equinopluteus. a. 72 horas; b. 8 días; c. estado premetamórfico.

Fig. 4. Echinopluteus larvae. a. 72 hours; b. 8 days; c. pre-metamorphic stage.

CUADRO 1
*Medidas (µm) de brazos y cuerpo en larvas
 de Lytechinus variegatus*

TABLE 1
*Measurements (µm) from the arms and the body
 of the larvae of Lytechinus variegatus*

| Día | Brazos (µm) | Cuerpo (µm) |
|-----|-------------|-------------|
| 1 | 183±1 | 182±1 |
| 3 | 364±2 | 280±1 |
| 4 | 415±1 | 310±2 |
| 6 | 472±2 | 380±1 |
| 8 | 580±3 | 400±2 |
| 10 | 364±2 | 425±3 |
| 12 | | 430±2 |
| 14 | | 446±1 |
| 18 | | 450±2 |

Giudice (1973) y Amy (1983). Aunque según Gómez (1999) el diámetro de los óvulos de esta especie es variable y llegan a medir hasta 130 µm. Por otro lado se menciona que la variabilidad en talla de los huevos de una misma especie es poca (Goldforb 1935, Harvey 1956, Amy 1983). Los espermatozoides tuvieron una longitud de 5±1x1.5 µm de ancho, valores coincidentes con los reportados por Amy (1983); aunque indica que en las especies de erizos las células espermáticas pueden variar desde 10 µm x 2 µm hasta 2µm x 0.7 µm.

Se obtuvo un porcentaje de fertilización del 90% utilizando una relación 1:100 entre óvulos y espermatozoides. A este respecto Pennington (1985) sostiene que con suspensiones relativamente densas de espermatozoides se obtienen los mayores porcentajes de fertilización y disminuye al diluir el esperma. La fecundación ocurrió de dos-tres minutos cuando se forma la membrana de fertilización, cuya función es prevenir la poliespermia (Giudice 1973). Al momento de la fecundación el óvulo cambió de color amarillo a blanco (Balinsky 1978); la segmentación del óvulo se inicia por la división del núcleo (el sincarión) y por lo general luego de

la división del núcleo sigue la división del citoplasma, de manera que la célula madre (huevo) se divide en dos células, que reciben el nombre de blastómeros. En este trabajo, los tiempos de desarrollo embrionario fueron medidos en minutos, así, la primera división celular (dos blastómeros) ocurrió a los 45 minutos de la fertilización y hasta la formación de 64 células transcurrieron 170 minutos. Cada vez que ocurre una división en la célula, los blastómeros resultantes son de menor tamaño por lo cual Balinsky (1978) afirma que los blastómeros no aumentan de tamaño antes de que empiece la siguiente división, por lo que después de cada división celular, los blastómeros resultantes tienen la mitad del tamaño original. Las fases de blástula y gástrula se observaron a los 250 y 565 min después de la fertilización, cuando la gástrula tiene una forma de cono alargado aparecen las espículas y se transforma en larva planctónica (Ruppert y Barnes 1996).

En esta investigación, el tiempo de la primera división celular fue ligeramente menor al que cita Amy (1983) para *L. variegatus* en Jamaica (50 min) en agua con una temperatura de 26±2 °C, también inferiores a los establecidos por Harvey (1956) en el sureste de los Estados Unidos (temperatura 22 °C) y en las Bermudas (24 °C) (55 min). Los erizos adultos (progenitores) de este ensayo fueron colectados en la Isla de Cubagua donde se registran temperaturas entre 24 y 29 °C (Gómez 2000) y luego fueron mantenidos en laboratorio (temperatura de 28±2 °C). Las diferencias en los tiempos de división pueden atribuirse a las localidades y periodos del año en que se colectan los erizos reproductores (Amy 1983).

Las larvas de erizo en estadio de prisma tienen una longitud de 140±2 µm, e inician su alimentación externa (Patton 1998). Esta fase se obtuvo a los 780 min (13 h) de la fertilización, siendo menor al mencionado por Amy (1983). A partir del estadio de prisma, las larvas fueron alimentadas con una dieta mixta de tres microalgas (*C. gracilis*, *Isochrysis* sp. y *T. chuii*), especies que han sido empleadas en el cultivo de peces marinos y de erizos (Hagen 1996, Eckert 1998, Gómez 1998). Este tipo de dieta debe ser

apropiada en calidad y en cantidad así como de un tamaño adecuado para su fácil captura y consumo por las larvas (Choy 1991).

Aproximadamente a los 1027 min (17 h) de la fertilización finalizó la fase prisma y la larva se denomina pluteus, (estadio de dos brazos). Según Amy (1983) esta fase se alcanza a los 1025 min, mientras que Roller y Stickle (1993) la obtuvieron al cabo de cuatro a cinco días después de la fecundación. Se menciona que *L. variegatus* es la especie de erizo que alcanza más rápidamente la fase pluteus (Amy 1983). Aproximadamente a las 72 h de la fertilización (estadio de cuatro brazos), disminuye el movimiento de la larva y sus brazos PO son más largos ($364 \pm 2 \mu\text{m}$) que el cuerpo, el cual tiene una longitud de $280 \pm 1 \mu\text{m}$ (Fig. 4a).

Al octavo día de desarrollo los brazos tuvieron una longitud máxima de $580 \pm 3 \mu\text{m}$ (Fig. 4b). Se menciona que la longitud máxima de los brazos de *L. variegatus* es menor a 1mm (Boidron-Metairon 1988). El cuerpo y los brazos de la larva, presentaron puntos de coloración roja, estos pigmentos también fueron observados por Eckert (1998) en larvas del erizo *Diadema antillarum*. Al décimo día de vida la larva había reabsorbido casi todos sus brazos quedando solamente un par, que en pocos días fueron reabsorbidos completamente (Cuadro 1).

Entre el décimo y duodécimo día de desarrollo el 80% de las larvas se desplazaron hacia el fondo del envase de cultivo se observó la presencia de los pies ambulacrales (Fig. 6) que aparentemente emplea para fijarse al sustrato. Según Michel (1985) las larvas ya no están presentes en la columna de agua al cabo de 23 días después de la fertilización. Cuando las larvas se hicieron bentónicas, la sobrevivencia larval disminuyó aproximadamente en un 50%. A este respecto, Hagen (1996) refiere que la densidad inicial (larvas por ml) en cultivos de erizos durante la etapa de establecimiento bentónico decrece de 1.5 a 0.8 larva/ml.

Aproximadamente a los 18 días de la fertilización ocurrió la metamorfosis de la larva pluteus a erizo juvenil, que midió aproximadamente

0.45 mm; el cuerpo tuvo forma redondeada y presentó espinas pequeñas. Se ha mencionado que el juvenil de *L. variegatus* tiene un tamaño de 0.5 mm (Michel 1985).

En este ensayo el tiempo de metamorfosis de *L. variegatus* fue similar al señalado por Boidron-Metairon (1988), pero es menor al que menciona Roller y Stickle (1993) y Michel (1985); también es inferior al referido por Eckert (1998) para otras especies de erizo, por ejemplo *D. antillarum* que requiere de 28 a 35 días.

La metamorfosis es un proceso importante en el ciclo de vida del erizo y se caracteriza por los cambios morfogenéticos de la larva al pasar a un hábitat bentónico. La transformación es muy rápida y ocurre en una hora aproximadamente (Ruppert y Barnes 1996) aunque no todas las larvas cambian al mismo tiempo, ya que según Michel (1985) hasta dos semanas después de la metamorfosis del primer erizo se pueden observar larvas en proceso de cambio. Para que la larva pueda sufrir esta transformación debe encontrarse en estado competente y tener a disposición un inductor adecuado; de lo contrario, en pocas horas la mortalidad puede ser del 100%.

Para inducir la metamorfosis de las larvas se utilizaron laminillas de asbesto y se suministró como alimento la macroalga *Ulva lactuca*, pero los resultados obtenidos fueron negativos. Sin embargo, las larvas tuvieron metamorfosis y se transformaron en juveniles que murieron a las pocas horas, lo cual sugiere que los inductores empleados no son los ideales para este fin, por lo que se recomienda continuar los ensayos empleando otros materiales, entre ellos el policarbonato que se menciona brinda buenos resultados en la larvicultura de otras especies de erizos (Hagen 1996).

RESUMEN

El erizo verde *Lytechinus variegatus* es una especie con potencial para la acuicultura tropical. En Venezuela, esta especie posee una importancia económica pero se desarrollo embrionario y larval no se ha estudiado. Se recolectaron especímenes de los pastos marinos de la Isla de

Margarita (Venezuela) y se mantuvieron en el laboratorio, donde desovaron naturalmente. Con agua de mar filtrada (temperatura 28 ± 2 °C y salinidad 37 psu) y aireación moderada, los huevos y el esperma fueron mezclados (relación 1:100) obteniéndose un porcentaje de fertilización del 90%. La formación de la membrana de fertilización ocurrió a los 2 min de mezclar los gametos. La primera división celular tuvo lugar a los 45 min., y la formación de prisma a las 13 horas. La larva equinopluteus se formó alrededor de las 17 horas y su metamorfosis se observó a los 18 días de vida planctónica cuando se dirige al fondo para iniciar su fase bentónica.

Palabras claves: Erizo de mar, *Lytechinus variegatus*, larva, desarrollo larval, cultivo, equinoideo, equinodermo.

REFERENCIAS

- Amy, R. 1983. Gamete sizes and developmental time tables of five tropical sea urchins. *Bull. Mar. Sci.* 33: 173-176.
- Balinsky, B. 1978. Introducción a la Embriología. Omega, S.A., Barcelona, España. 644 p.
- Boidron-Metairon, I. 1988. Morphological plasticity in laboratory-reared echinoplutei of *Dendraster excentricus* (Eschscholtz) and *Lytechinus variegatus* (Lamarck) in response to food conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119: 31-41.
- Choy, S. 1991. Embryonic and larval biology of *Liocarcinus holsatus* and *Necora puber* (Crustácea) Brachyura: Portunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 148: 77-79.
- Eckert, G. 1998. Larval development, growth and morphology of the sea urchin *Diadema antillarum*. *Bull. Mar. Sci.* 63: 443-451.
- Giudice, G. 1973. Developmental biology of the sea urchin embryo. Academic Press, New York. London 469 p.
- Goldforb, A. 1935. Change in size and shape of aging eggs (*Arbacia punctulata*). *Biol. Bull.* 68: 180-190.
- Gómez, A. 1999. Los Recursos Marinos Renovables del Estado Nueva Esparta Venezuela. Biología y Pesca de Especies Comerciales. Tomo I. Invertebrados y Algas. Caracas. 208 p.
- Gómez, A. 2000. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la Isla de Cubagua, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 48: 125-131.
- Gómez, O. 1998. Análisis del contenido de ácidos grasos del rotífero *Brachionus plicatilis*, alimentado con tres especies de microalgas. Trabajo de Postgrado. Universidad de Oriente, Sucre. 93 p.
- Hagen, N. 1996. Echinoculture: from fishery enhancement to closed cycle cultivation. *World Aquac.* 27: 7-19.
- Harvey, G. 1956. The american and other sea urchin. Princeton, Univ. Princeton, New Jersey. 298 p.
- Hugh, S., S. Watts, J. Lawrence, A. Lawrence & C. McClintock. 2001. The effects of dietary protein on the production and proximate composition of gonads in the edible sea urchin *Lytechinus variegatus*. Book of abstracts. The International Triennial Conference & Exposition of World Aquaculture Society. 270.
- McEdward, L. & Herrera, J. 1999. Body form and skeletal morphometrics during larval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* Lamarck. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232: 151-176.
- Maeve, K., Hunter, A., Scholfield, C. & McKenzie, D. 2000. Morphology and survivorship of larval *Psammechinus miliaris* (Gmelin) (Echinodermata: Echinoidea) in response to varying food quantity and quality. *Aquaculture*, 183: 223-240.
- Michel, H. 1985. Culture of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) from egg to young adults. *Bull. Mar. Sci.* 34: 312-314.
- Patton, C. 1998. <http://www.stanford.edu/group/urchin/urchin/htm>.
- Pennington, T. 1985. The ecology of the fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation and synchronous spawning. *Biol. Bull.* 450: 417-429.
- Roller, R. & W. Stickle. 1993. Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.* 116: 583-591.
- Ruppert, E. & R. Barnes. 1996. Zoología de los Invertebrados. McGraw-Hill Interamericana S.A. México. 1114 p.
- Wallace, B., H. Hammer, S. Watts, J. Lawrence & A. Lawrence. 2001. The effects of dietary protein on growth of juvenile sea urchins. Book of abstracts. The international triennial conference & exposition of World Aquaculture Society. 674 p.