

*Research Article*

## Efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre el desarrollo temprano del nudibranquio *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) en condiciones de laboratorio

Margarita Pérez-Valdés<sup>1</sup> & Ramiro Contreras-Guzmán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Los Lagos, Osorno, Chile

<sup>2</sup>Subsecretaría de Pesca, Aysén, Chile

Corresponding author: Margarita Pérez (macepe@ulagos.cl)

**RESUMEN.** La temperatura juega un rol importante tanto en el desarrollo como en el crecimiento de invertebrados marinos; de manera similar el fotoperiodo afecta significativamente la alimentación, crecimiento y supervivencia larval. En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura (10° y 16°C) y el fotoperiodo (8:16 y 16:8) sobre el desarrollo temprano, eclosión y supervivencia larval del nudibranquio *Diaulula punctuolata*, en condiciones de laboratorio. A 16°C/8:16, la eclosión ocurrió entre 10 y 11 días post-desove (dpd); con un tiempo fisiológico de  $162,3 \pm 10,1$  día-grado (d°C), mientras que a 10°C/8:16 ocurrió entre 17 y 20 dpd;  $200,5 \pm 27,4$  d°C ( $F = 366,6$ ;  $P < 0,05$ ). El mayor porcentaje de eclosión 82,9% se obtuvo a 10°C, ( $F = 16,63$ ;  $P < 0,05$ ) coincidiendo con las condiciones ambientales presentes en la época de recolección de los adultos. Las larvas obtenidas a 16°C fueron más grandes ( $146,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ) que a 10°C ( $140,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ) ( $F = 212$ ;  $P < 0,05$ ); sin embargo, el tiempo de supervivencia fue mayor a 10°C/8:16 (21 dpd) lo que podría estar asociado a una mayor acumulación de nutrientes durante el desarrollo embrionario. Tanto el desarrollo embrionario como larval dependen de la temperatura pero no del fotoperiodo, un aumento de temperatura de 10° a 16°C, redujo el tiempo cronológico hasta la eclosión en un  $45,6 \pm 3,4\%$ . El fotoperiodo afectó la supervivencia larval sólo a 10°C.

**Palabras clave:** nudibranquios, ovipostura, larva velígera, eclosión, fotoperiodo, tiempo fisiológico.

## Effect of temperature and photoperiod on the early development of nudibranch *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) under laboratory conditions

**ABSTRACT.** Temperature plays an important role in both the development and growth of marine invertebrates; furthermore, it has been observed that photoperiod significantly affects feeding, growth and larval survival. In this study we evaluated the effect of temperatures of 10° and 16°C and photoperiods of 8:16 and 16:8 on early development, hatching and larval survival in the nudibranch *Diaulula punctuolata*, under laboratory conditions. At 16°C/8:16, hatching occurred between 10 and 11 days post-spawning (dps), with a physiological time of  $162.3 \pm 10.1$  degree day (d°C); while at 10°C/8:16, hatching took place between 17 and 20 dps;  $200.5 \pm 27.4$  d°C ( $F = 366.6$ ;  $P < 0.05$ ). The highest hatching percentage, 82.9%, was obtained at 10°C ( $F = 16.63$ ;  $P < 0.05$ ) coinciding with environmental conditions present during the adult collection season. Larvae obtained at 16°C were larger ( $146.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ) than those at 10°C ( $140.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ) ( $F = 212$ ;  $P < 0.05$ ). Nevertheless, survival time was greater at 10°C/8:16 (21 dps), which could be associated with greater nutrient accumulation during embryonic development. Both embryonic and larval development are dependents on temperature, but not on photoperiod; an increase in temperature from 10° to 16°C, reduced the chronological time required up to hatching by  $45.6 \pm 3.4\%$ . Photoperiod only affected larval survival at 10°C.

**Keywords:** nudibranchs, spawning, veliger larvae, hatching, photoperiod, physiological time.

### INTRODUCCIÓN

Para lograr un cultivo exitoso de una especie que tiene desarrollo indirecto, es fundamental conocer las con-

diciones ambientales que determinan los diferentes eventos reproductivos: ciclo gametogénico (Giese & Pearce, 1974), desarrollo de los huevos (Yang & Chen, 2005), eclosión, desarrollo larval y finalmente, asenta-

miento y metamorfosis. Las señales ambientales controlan o sincronizan los ciclos reproductivos de muchos invertebrados marinos. Se ha demostrado que el fotoperiodo y la temperatura son las señales que ajustan la reproducción ya sea en forma combinada o individualmente, y son fundamentales para asegurar que las larvas sean liberadas o se desarrollen durante el período de abundancia de alimento. Esto se logra vinculando aspectos de la reproducción al ciclo estacional de temperatura y/o fotoperiodo, dos factores físicos fundamentales que también influyen en los ciclos biológicos, como la producción de fitoplancton (Lawrence & Soame, 2004).

La temperatura es una de las variables ambientales que juega un rol importante tanto en el desarrollo como en el crecimiento de invertebrados marinos, ya que bastan pequeños incrementos de temperatura de 1°C durante la fase exponencial de crecimiento, para generar grandes diferencias en la talla entre individuos de una misma cohorte (Pecl *et al.*, 2004). En numerosos invertebrados marinos, incluyendo los moluscos, se ha observado una disminución del período de encapsulación a medida que aumenta la temperatura, dentro de los rangos específicos de tolerancia térmica (Przeslawski, 2004). Al mismo tiempo, la temperatura tiene un efecto inverso sobre los tiempos de desarrollo larval (Davis & Calabrese, 1964; Zimmerman & Pechenik, 1991) y sobre la supervivencia larval (Calabrese, 1969). Mientras que el fotoperiodo afecta significativamente la alimentación, crecimiento y supervivencia de organismos marinos (Minagawa & Murano 1993; Minagawa, 1994; Hart *et al.*, 1996).

Si bien la reproducción y desarrollo de Opisthobranchia se ha estudiado por más de 150 años (Wolf & Young, 2012), la evaluación del efecto de la temperatura sobre los tiempos de desarrollo temprano en varias especies, se remonta solo a los últimos 30 años (Watt & Aiken, 2003) y en estos trabajos siempre se encontró una correlación negativa entre tiempos de desarrollo y temperatura (Thompson, 1966; Lalli & Conover, 1973; Perron & Turner 1977; Dehnel & Kong, 1979; Todd & Havenhand, 1985; Farfan & Ramírez, 1988; Watt & Aiken, 2003).

Los opistobranquios son altamente variables respecto de las épocas de desarrollo, periodos embrionarios, modos de desarrollo, duración larval, inductores de metamorfosis y tasas de crecimiento (Wolf & Young, 2012). El uso de novedosos sistemas de defensa en base a secreciones ácidas que son producidas cuando los animales son molestados (Edmunds, 1968; Kubanek *et al.*, 1997); la presencia de metabolitos secundarios como los terpenoides obtenidos a través de la ingestión de esponjas, algas y tunicados en nudibranquios doridos (Faulkner &

Ghiselin, 1983; Gosliner, 1987; Pawlik *et al.*, 1988; Pawlik, 2012) o la producción de sus propias defensas químicas *de novo* (Cimino *et al.*, 1985; Barsby *et al.*, 2002), permiten suponer que en el futuro, estas sustancias podrían ser utilizadas por la industria farmacológica. El conocimiento de aspectos reproductivos, de desarrollo larval y su relación con variables ambientales, es indispensable cuando se desea implementar un cultivo. Por otra parte, la fácil aclimatación, obtención de posturas en condiciones artificiales (Rudman, 2000; Gibson, 2003; Contreras & Pérez, 2010), presencia de múltiples huevos por cápsula, eclosión de larvas planctotróficas (Muniain *et al.*, 2001) o embriogénesis intracapsular (Bonar, 1978), permiten utilizar a las especies de este grupo como modelos biológicos para evaluar el efecto de factores ambientales como la temperatura y el fotoperiodo, ambos sujetos a modificación producto del cambio climático (Lawrence & Soame, 2004; Przeslawski, 2004). Considerando estas características, se seleccionó al nudibranquio Dorido, *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837), para evaluar el efecto de las variables temperatura y fotoperiodo sobre el desarrollo temprano.

Como la mayoría de los nudibranquios, *D. punctuolata* es un hermafrodita simultáneo con fecundación cruzada interna (Todd & Doyle, 1981). Se encuentra desde el intermareal rocoso hasta 7 m de profundidad (Zagal & Hermosilla, 2001) y se distribuye a lo largo de las costas de Perú, Chile y Argentina (Schrohdl, 1996; Valdés & Muniain, 2002). Antecedentes reproductivos señalan que estos animales ponen sus ovicápsulas embebidas en una matriz gelatinosa que forma una cinta enrollada en espiral de aproximadamente 30-50 mm de diámetro. Cada ovicápsula, contiene de uno a tres embriones (Contreras & Pérez, 2010). Los estados de desarrollo embrionario descritos son: eliminación del primer corpúsculo polar, embrión de dos células, tetrada, mórula, trocófora intracapsular y velígera intracapsular; eclosionando una larva en estado de velígera planctotrófica ~20 días post-postura (Contreras & Pérez, 2010).

De acuerdo a los antecedentes revisados se plantea como hipótesis que: tanto el aumento de la temperatura como del fotoperiodo acortan el período de desarrollo embrionario y aumentan la supervivencia larval en *D. punctuolata* existiendo además, un efecto combinado de ambas variables. Para comprobar lo anterior se formuló como objetivo determinar el efecto de la temperatura y el fotoperiodo en el desarrollo embrionario, porcentaje de eclosión, supervivencia y crecimiento larval del nudibranquio *D. punctuolata*, en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de ejemplares y obtención de las posturas

Se recolectaron, mediante buceo, 32 ejemplares de *D. punctuolata* de longitud total entre 30 y 60 mm, entre marzo y mayo de 2006 (otoño), a una profundidad máxima de 7 m, en la localidad de Bahía Mansa (40°37'S, 71°48'W), Osorno, Chile. Los individuos se trasladaron al Laboratorio de Cultivos Marinos de la Universidad de los Lagos en Osorno, donde fueron separados en dos grupos de ocho acuarios cada uno y se mantuvieron entre 10 y 16°C. En cada acuario de 1 L (n = 16) se dispuso una pareja, mantenida con agua de mar filtrada (1,0 µm), aireación constante, fotoperiodo 8:16 y salinidad de 33 hasta la obtención de las oviposturas. Cuando se obtuvo una ovipostura por pareja, los adultos se retiraron del acuario y se midió su longitud y ancho; de cada ovipostura se obtuvo una muestra de 5 mm<sup>2</sup> aproximadamente, para determinar el número de embriones por cápsula y el número de cápsulas por postura, siguiendo la metodología descrita por Contreras & Pérez (2010).

### Desarrollo embrionario

Cada ovipostura se dejó en un acuario de 1 L con agua de mar filtrada (0,45 µm), aireación permanente, salinidad de 33 y recambio total de agua cada tres días. Se trabajó con dos temperaturas 10°C y 16°C y dos fotoperiodos 08:16 h y 16:08 h en un diseño factorial de 2 x 2 generando cuatro sistemas experimentales (10°C/8:16; 10°C/16:8; 16°C/8:16; 16°C/16:8) en triplicado. Los sistemas 10°C/8:16 y 16°C/16:8 corresponden a condiciones ambientales de temperatura y luz promedio en el período otoño-invierno y primavera-verano respectivamente, en la zona de muestreo. Para generar las condiciones experimentales se utilizaron dos baños termostáticos Memmert WB-14; sobre cada uno de ellos se instaló una caja negra isométrica de 0,7 m por lado, equipada con una lámpara de luz fría de 18 w conectada a un timer. Las observaciones se efectuaron cada una hora desde el término del desove hasta el estado de mórula y luego diariamente hasta la eclosión.

Se definieron seis estados ontogenéticos, previos a la velígera de eclosión: eliminación del primer corpúsculo polar, embrión de dos células, tetrada, mórula, larva trocófora y larva velígera intracapsular. En todos los sistemas experimentales el tiempo aproximado hasta la eclosión se expresó en días post-desove (dpd). Además, se determinó el tiempo fisiológico en función de día-grado (d°C); el cálculo se efectuó sumando la temperatura promedio diaria desde la ovipostura hasta la obtención de cada estado de

desarrollo (°C x días) (Cingi *et al.*, 2000; Uriarte *et al.*, 2012).

El porcentaje de eclosión se calculó para cada condición experimental, basado en el número de embriones por cápsula, número de cápsulas por ovipostura y cantidad de larvas eclosionadas.

### Efecto de la temperatura y fotoperiodo en la supervivencia larval

Las larvas se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo y salinidad que las oviposturas. Se cultivaron 0,2 larvas mL<sup>-1</sup> en acuarios de 500 mL conteniendo agua de mar filtrada (0,45 µm), con aireación constante y recambio total de agua cada tres días. Diariamente se agregó alimento en exceso consistente en una mezcla 1:1 de *Isochrysis galbana* y *Dunaliella tertiolecta* hasta alcanzar una concentración aproximada de 10<sup>3</sup> cél mL<sup>-1</sup> o el equivalente a 5000 cél larva<sup>-1</sup> similar a la utilizada por Bickell & Chia (1979) en larvas de *Doridella steinbergae*. Se utilizaron cuatro acuarios por cada condición experimental.

La supervivencia fue estimada cada 2 días, para lo cual se eliminaron las larvas muertas desde el fondo de cada acuario y las larvas vivas se llevaron a un volumen conocido utilizando una probeta de 100 mL. El recuento de larvas se efectuó en alícuotas de 1 mL (n = 3 por acuario) y el número de larvas por acuario se estimó extrapolando al volumen del acuario el número promedio de larvas en las alícuotas.

### Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue verificada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad de varianza por medio de la prueba de Bartlett (Sokal & Rohlf, 1969). Se aplicó una ANDEVA de dos vías, para evaluar el efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre los tiempos de eclosión y crecimiento larval previa transformación logarítmica y sobre el porcentaje de eclosión previa transformación arcoseno, asumiendo un grado de significancia de  $P < 0,05$ . El efecto de la temperatura sobre la fecundidad se evaluó con un ANCOVA utilizando como covariable la talla de los reproductores. Cuando existieron diferencias significativas se aplicó la prueba *a posteriori* de Tukey (Sokal & Rohlf, 1969). Para los análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat/L.

## RESULTADOS

### Obtención de posturas y desarrollo embrionario

El período de obtención de las posturas, posterior a la llegada al laboratorio de los reproductores, varió desde

2 h a una semana. De las 16 parejas instaladas se obtuvieron 12 oviposturas y la longitud mínima y máxima de las oviposturas fue de 110 y 510 mm a 10°C y de 220 y 560 mm a 16°C, respectivamente. La fecundidad absoluta mínima a 10°C fue de 15.680 huevos para un ejemplar de 43,2 mm de longitud y la máxima fue de 158.666 huevos para un ejemplar de 51,5 mm de longitud. En los ejemplares mantenidos a 16°C el valor mínimo fue de 36.259 huevos y el máximo de 162.400 huevos por ejemplar de 43,4 y 56,5 mm de longitud respectivamente (Tabla 1). No se encontraron diferencias significativas al comparar la fecundidad absoluta entre ambas temperaturas, utilizando como covariable la talla ( $P = 0,066$ ).

El tiempo de desarrollo embrionario de *D. punctuolata*, hasta la eclosión, no varió significativamente con el fotoperiodo ( $F = 0,48$ ;  $P > 0,05$ ), pero sí con la temperatura ( $F = 366,6$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabla 2). Las oviposturas mantenidas en el sistema experimental a 16°C eclosionaron en un período de 10-11 días ( $162,3 \pm 10,1 - 183,8 \pm 10$  d°C), que fue significativamente menor que a 10°C, 17-20 días ( $177,9 \pm 12,3 - 200,5 \pm 27,4$  d°C) (Tabla 2). No se observó efecto combinado de temperatura y fotoperiodo, sobre los tiempos de desarrollo embrionario hasta la eclosión ( $F = 6,05$ ;  $P > 0,05$ ).

#### Efecto de la temperatura y fotoperiodo en el porcentaje de eclosión, crecimiento y supervivencia larval

El porcentaje de eclosión fue significativamente mayor a 10°C/8:16 ( $82,9 \pm 3,4\%$ ) que en los otros sistemas experimentales ( $<50\%$ ) ( $F = 16,6$ ;  $P < 0,05$ ) (Fig. 1). El fotoperiodo no tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de eclosión ( $F = 0,43$ ;  $P > 0,05$ ), sin embargo hubo efecto combinado temperatura-fotoperiodo, siendo

significativamente mayor a 10°C/8:16 ( $F = 10,5$ ;  $P < 0,05$ ) (Fig.1).

Las larvas que eclosionaron a 16°C fueron significativamente mayores ( $146,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ) que a 10°C ( $140,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ) ( $F = 212$ ;  $P < 0,5$ ). No se observó efecto del fotoperiodo ( $F = 2$ ;  $P > 0,05$ ) ni efecto combinado de la temperatura con el fotoperiodo ( $F = 1,6$ ;  $P > 0,05$ ) sobre el tamaño de eclosión.

Aun cuando no se obtuvo asentamiento ni metamorfosis, el mayor tiempo de supervivencia larval (21 dpe = días post-eclosión) se obtuvo en la condición de 10°C/8:16 (Fig. 2), mientras que en los otros tratamientos el tiempo máximo de supervivencia fue de 11 dpe para la condición de 10°C/16:8 y 9 dpe para la condición 16°C/8:16. El fotoperiodo afectó significativamente la supervivencia larval, pero sólo a 10°C, siendo mayor el tiempo de supervivencia con fotoperiodo 8:16 ( $F = 26,41$ ;  $P < 0,05$ ); en esta condición experimental el 50% de la mortalidad se produjo el día 9 post-eclosión, mientras que en las otras tres condiciones ocurrió al día 3 post-eclosión (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

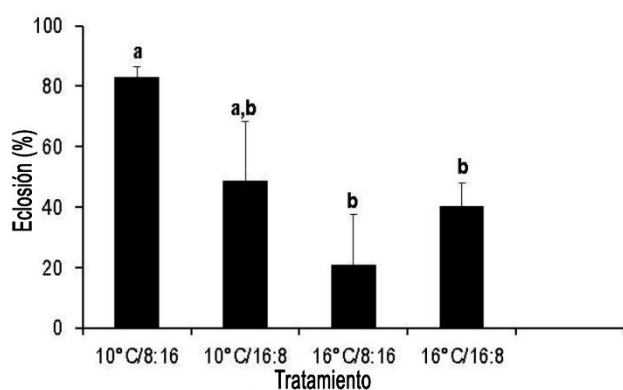
La obtención de oviposturas en *Diaulula punctuolata* es relativamente rápida y fácil, dado que desova un animal de cada pareja en un período menor a una semana después de su llegada al laboratorio. Si bien *D. punctuolata*, en condiciones de laboratorio, presenta una fecundidad absoluta que varía entre 15.680 y 162.400 huevos, está por debajo del millón de huevos registrado tanto para esta misma especie en condiciones silvestre (Häussermann & Fösterra, 2009) como para el nudibranquio del Mediterráneo, *Spurilla neapolitana*

**Tabla 1.** Datos reproductivos de ejemplares de *Diaulula punctuolata* acondicionados a dos temperaturas, 10°C y 16°C. \*Adultos que ovipusieron.

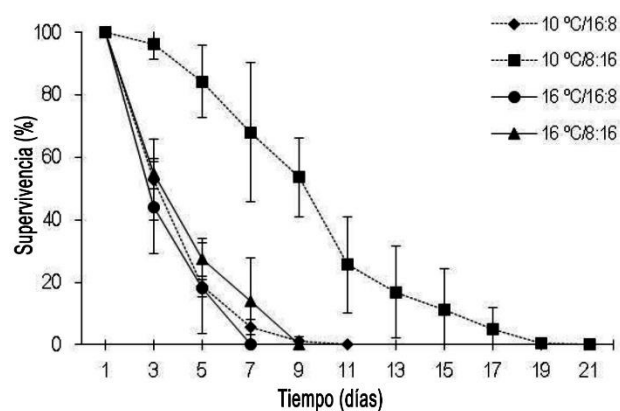
T°	Datos ovipostura				Datos reproductivos						
	Talla adultos (mm)(*)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Area (mm <sup>2</sup> )	Fecundidad absoluta	Fecundidadrelativa (huevos/mm)	Densidad (huevos/mm <sup>2</sup> )	Total larvas velígera	Porcentaje eclosión		
10 ° C	8:16	35,6	139	4	556	54.968	1.544,0	98,9	47.536	86,5	
		38,7	310	4	1.240	72.330	1.869,0	58,3	57.640	79,7	
		43,2	110	5	550	15.680	363,0	28,5	12.938	82,5	
		43,3	200	5	1.000	25.296	584,2	25,3	16.688	65,9	
		16:8	51,5	510	5	2.550	158.666	3.080,9	62,2	42.507	26,8
16 ° C		60,4	450	6,5	2.925	127.842	2.116,6	43,7	67.347	52,7	
		33,2	310	3	930	66.843	2.013,3	71,9	24.097	36,1	
		8:16	43,4	220	6	1.320	36.259	835,5	27,5	8.485	23,4
			43,5	320	3	960	40.175	923,6	41,9	1.028	2,6
			45,1	220	6	1.800	60.000	1.330,4	33,3	26.796	44,7
	16:8	46,8	276	4	1.104	52.040	1.112,0	47,1	16.330	31,4	
		56,5	560	4	2.240	162.400	2.874,3	72,5	72.934	44,9	

**Tabla 2.** Tiempo fisiológico promedio ( $\pm$ DE), en día-grado ( $^{\circ}$ C) requerido para alcanzar cada estado de desarrollo embrionario hasta la eclosión, a  $10^{\circ}$ C y  $16^{\circ}$ C y fotoperiodos de 8:16 y 16:8.

Temperatura	10°C		16°C	
	8:16	16:8	8:16	16:8
Corpúsculo polar	1,0(0,3)	1,5(0,4)	0,9(0,4)	1,5(0,2)
Segunda división	5,4(1,9)	5,2(1,4)	3,7(0,5)	5,0(0,5)
Tetrada	8,6(1,0)	8,5(0,5)	5,3(0,9)	8,3(2,0)
Mórula	16,3(2,5)	13,8(1,3)	14,2(2,2)	13,7(0,5)
Trocofora	93,0(5,7)	77,9(12,2)	72,3(8,2)	64,5(2,1)
Velígera intracapsular	118,0(10,2)	97,9(13,2)	104,3(5,7)	94,5(2,7)
Eclosión	200,5(27,4)	177,9(12,3)	183,8(10,0)	162,3(10,1)
Tiempo hasta la eclosión (días)	20,1(2,7)	17,8 (1,2)	11,5(0,2)	10,7(0,9)

**Figura 1.** Porcentaje de eclosión promedio ( $\pm$ DE) en *D. punctuolata* a dos temperaturas  $10^{\circ}$  y  $16^{\circ}$ C y dos fotoperiodos 8:16 y 16:8. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas (ANDEVA de dos vías y análisis posterior de Tukey,  $P < 0,05$ ).

(de le Chiaje, 1841) el cual también presenta larva planctotrófica (Schlesinger *et al.*, 2009). Sin embargo, es más alta que la descrita para otras especies de nudibranchios opisthobranquios de la zona del Caribe:  $160,2 \pm 20,9$  huevos en *Elysia tuca* (Marcus & Marcus, 1967) (Krug, 2009); 1.020 en *E. crispate* (Morch, 1863) y 470 para *E. subornata* (Verrill, 1901) (DeFreese & Clark, 1983). A excepción de *E. tuca* que tiene larva lecitotrófica, las otras dos especies presentan desarrollo directo, por lo que claramente la alta fecundidad de *D. punctuolata* está relacionada con la estrategia de desarrollo indirecto y la presencia de larva planctotrófica que además permanece un tiempo prolongado de al menos 19 días en el plancton. La estrategia reproductiva de *D. punctuolata* se ajusta al patrón mixto con encapsulación, desarrollo indirecto y larva planctotrófica (Brusca & Brusca, 2003). En este patrón de desarrollo, la fuente inicial de nutrición y protección es la cápsula, y el gasto energético en el adulto está orientado a la producción de gametos, cápsulas y la ma-

**Figura 2.** Porcentaje promedio de supervivencia ( $\pm$ DE) en larvas de *D. punctuolata* mantenidas a dos temperaturas  $10^{\circ}$  y  $16^{\circ}$ C y dos fotoperiodos 8:16 y 16:8.

triz que las contiene además del vitelo que asegura el desarrollo de los embriones hasta el estado de velígera. Sin embargo, la larva planctotrófica se ve sometida a la presión de depredación y competencia por el alimento, por lo cual la respuesta adaptativa es la producción de un gran número de huevos lo que redundará en una alta fecundidad.

La talla de eclosión ( $140,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$  y  $146,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ) en *D. punctuolata* fue similar a la descrita para otros nudibranchios con desarrollo indirecto, como *Doridiella steinbergae* (Lance, 1962) con  $142,0 \mu\text{m}$  (Bickell & Chia 1979) y *Janolus fuscus* (O'Donoghue, 1924) con  $123,0$ - $153,8 \mu\text{m}$  (Wolf & Young, 2012), pero aproximadamente un 50% más pequeña que la larva lecitotrófica de *E. tuca*  $275,8 \pm 3,9 \mu\text{m}$  (Krug, 2009). Este patrón es concordante con el modelo de desarrollo y la inversión de energía, que en la especie analizada está destinada a producir un gran número de larvas pequeñas.

En *D. punctuolata*, tanto el tiempo de desarrollo embrionario como larval dependen de la temperatura,

**Tabla 3.** Comparación del tiempo acumulado hasta la eclosión y su equivalente en tiempo fisiológico para *D. punctuolata* y otras especies de opistobranquios. dpd: días post-desove. \*Se estimó con la temperatura promedio

Especie/autor	Tiempo acumulado (DPD)	Temperatura (°C)	Tiempo fisiológico (d°C)	Tipo de larva
<i>Diaulula punctuolata</i> (este trabajo)	20	10	162,3 ± 10,1	planctotrófica
<i>D. punctuolata</i> (este trabajo)	11	16	183,8 ± 10,0	planctotrófica
<i>Bergia verrucicornis</i> , (Carroll & Kempf, 1990)	11 a 12	25	262,9-286,9	planctotrófica
<i>Elisia zuleica</i> (Krug, 2009)	5-7	25	125-175	planctotrófica
<i>E. zuleica</i> (Krug, 2009)	18,5 ± 0,5	25	462,5 ± 12,0	lecitotrófica
<i>E. tuca</i> (Krug, 2009)	18,0 ± 0,6	25	452,5 ± 15,0	lecitotrófica
<i>Janolus fuscus</i> (Wolf & Young, 2012)	10-18	11-13	120-216*	planctotrófica
<i>Spurilla neapolitana</i> (Schlesinger <i>et al.</i> , 2009)	3,0 ± 0,4	24	72 ± 0,96	planctotrófica
<i>Doridella steinbergae</i> (Bickell & Chia, 1979)	7,5-8	12-15	101,3-108*	planctotrófica
<i>D. steinbergae</i> (Bickell & Chia, 1979)	11-12	9-10	104,5-114*	planctotrófica

pero no del fotoperiodo. Un aumento de 6°C, redujo el tiempo cronológico hasta la eclosión en casi un 60% (Tabla 2), esto representa un ventaja para la sobrevivencia en el ambiente. El menor tiempo obtenido a 16°C coincide con lo descrito para el opistobranquio *Bergia verrucicornis* (A. Costa, 1864), que a 23,9 ± 1,3°C eclosiona a los 11 a 12 dpd (Carroll & Kempf, 1990) y con *D. steinbergae*, cuyo desarrollo embrionario dura 7 a 8 días a 12-15°C (Bickell & Chia, 1979).

La temperatura controla la tasa de desarrollo de muchos organismos, especialmente poiquiloterms y heteroterms, los cuales requieren la acumulación de cierta cantidad de calor para pasar de un estado de desarrollo ontogenético a otro, lo que se conoce como tiempo fisiológico. A 10°C *D. punctuolata* requiere aproximadamente un 50% más de calor acumulado o tiempo fisiológico que a 16°C, para alcanzar cada estado de desarrollo ontogenético hasta la eclosión (Tabla 2). Al comparar los resultados para el tiempo fisiológico del presente trabajo, con los obtenidos para otras especies de nudibranquios se puede observar una estrecha relación con el patrón de desarrollo. Así, aquellas especies que tienen un patrón de desarrollo indirecto con larva planctotrófica, presentan valores <200 d°C, mientras que en las especies con un patrón de desarrollo indirecto con larva lecitotrófica, el tiempo fisiológico es >400 d°C (Tabla 3). Esta dependencia de la temperatura implica que a una misma temperatura, una especie con desarrollo directo presentaría un tiempo de desarrollo hasta la eclosión muy superior al de que una especie planctotrófica.

Si bien la talla de eclosión fue significativamente mayor a 16°C, el porcentaje de eclosión en *D. punctuolata* estuvo sobre el 80% en las oviposturas mantenidas a 10°C/8:16 que correspondería a las condiciones de otoño-invierno, época en que fueron capturados los reproductores. En cambio cuando las oviposturas se mantuvieron a 16°C/16:8, equivalente a

las condiciones de primavera-verano el porcentaje de eclosión alcanzó el 40% (Tabla 1). Esta respuesta se podría asociar a que la mayor tasa de crecimiento a mayor temperatura aumentaría el consumo total de vitelo generando a la vez una acumulación insuficiente de reservas para la supervivencia posterior (Liddy *et al.*, 2004). El acortamiento del período embrionario con el aumento de la temperatura podría ser ventajoso si el organismo que eclosiona primero encuentra más alimento y crece más rápido (Uriarte *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente trabajo las larvas que eclosionaron a 16°C presentaron una fuerte caída en la supervivencia, que alcanzó al 50% en el día 3 post-eclosión (Fig. 2). Esto podría estar relacionado a un aumento en la demanda metabólica que se producen en ectoterms cuando son sometidos a altas temperaturas pudiendo experimentar déficit de oxígeno (Woods & Moran, 2008). Al respecto, se ha demostrado que un aumento de temperatura de 18 a 21°C aumenta el metabolismo en embriones de *Octopus mimus* (Uriarte *et al.*, 2012), mientras que en el nudibranquio *Dendronotus frondosus* (Acanius, 1774) un aumento de temperatura de 11 a 15°C detuvo el desarrollo embrionario en la eliminación del segundo corpúsculo polar (Watt & Ayken, 2003). La mortalidad total de las larvas mantenidas a 10°C a los 19 días y la imposibilidad de obtener asentamiento y metamorfosis se debería a la dieta ofrecida, ya que las larvas de *D. punctuolata* fueron alimentadas solo con microalgas y los antecedentes entregados para *Aplysia oculifera* (Adams & Reeve, 1850), muestran que se obtuvo asentamiento y supervivencia solo cuando fueron alimentadas con *Enteromorpha intestinalis* (Linnaeus) Nees, 1820, además de microalgas (Rudman, 2000).

En varias especies se ha demostrado una fuerte relación entre la tolerancia a la temperatura superior y la temperatura máxima del hábitat (Sorte *et al.*, 2011), lo cual demuestra que hay un efecto de esta variable

sobre los patrones de distribución. En *D. punctuolata* se obtuvo mayor supervivencia en larvas mantenidas a 10°C y fotoperiodo 8:16, que corresponde a las condiciones de otoño-invierno. Probablemente, la mejor respuesta de estas larvas se debe a que las condiciones experimentales de temperatura y fotoperiodo son similares a las condiciones de otoño, que fue la época de recolección de los ejemplares adultos, además los antecedentes reproductivos sobre esta especie indican la presencia de oviposuras en el medio natural durante el verano y otoño austral (37°S) (Häussermann & Försterra, 2009).

Se puede concluir que *D. punctuolata* presenta un patrón de desarrollo mixto con alta fecundidad, presencia de cápsulas bentónicas y eclosión de una larva planctotrófica pequeña, coincidiendo con las características de otros nudibranquios de similar patrón de desarrollo. Los estados tempranos son dependientes de la temperatura ya que un aumento de ésta acorta el período de desarrollo embrionario, pero disminuye el porcentaje de eclosión y supervivencia larval. El fotoperiodo tiene un efecto menos notorio, pero su disminución mejora la supervivencia larval a 10°C observando un efecto combinado de ambas variables sobre el porcentaje de eclosión, el cual se incrementa significativamente en las condiciones 10°C/8:16.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Cultivos Marinos de la Universidad de Los Lagos, por el aporte en infraestructura y equipamiento para el desarrollo de las experiencias, al proyecto FONDEF D01159 por el financiamiento de las salidas a terreno y a Susan Angus por el trabajo de traducción.

### REFERENCIAS

- Barsby, T., R.G. Linington & R.J. Andersen. 2002. De Novo terpenoid biosynthesis by the dendronotid nudibranch *Melibe leonina*. *Chemoecology*, 12(4): 199-202.
- Bickell, L.R. & F.S. Chia. 1979. Organogenesis and histogenesis in the planktotrophic veliger of *Doridella steinbergae* (Opisthobranchia: Nudibranchia). *Mar. Biol.*, 52(4): 91-313.
- Bonar, D. 1978. Morphogenesis at metamorphosis in opisthobranch mollusks. In: F. Chia & M. Rice (eds.). *Settlement and metamorphosis of marine invertebrates larvae*. Elsevier, New York, pp 177-196.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Sunderland, 936 pp.
- Calabrese, A. 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). *Biol. Bull.*, 137(3): 417-428.
- Carroll, D. & S. Kempf. 1990. Laboratory culture of the aeolid nudibranch *Berghia verrucicornis* (Mollusca, Opisthobranchia): some aspects its development and life history. *Biol. Bull.*, 179: 243-253.
- Cimino, G.S., S. De Rosa, S. De Stefano, R. Morrone & G. Sodano. 1985. The chemical defense of nudibranch mollusks: structure, biosynthetic origin and defensive properties of terpenoids from the dorid nudibranch *Dendrodoris grandiflora*. *Tetrahedron*, 41(6): 1093-1100.
- Cingi, S., M. Keinänen & P.J. Vuorinen. 2000. Elevated water temperature impairs fertilization and embryonic development of whitefish *Coregonus lavaretus*. *J. Fish Biol.*, 76: 502-521.
- Contreras, R. & M. Pérez. 2010. Desarrollo embrionario y larval temprano en *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) (Nudibranchia: Doridacea), en condiciones de laboratorio. *Amici Molluscarum*, 18: 13-20.
- Davis, H. & A. Calabrese. 1964. Combined effects of temperature and salinity on development of eggs and growth of larvae of *M. mercenaria* and *C. virginica*. *Fish. Bull.*, 63(3): 643-655.
- DeFreese, D.E. & K.B. Clark. 1983. Analysis of reproductive energetics of Florida Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Int. J. Invertebr. Rep.*, 6: 1-10.
- Dehnel, P.A. & D.C. Kong. 1979. The effect of temperature on developmental rates in the nudibranch *Cadlina luteomarginata*. *Can. J. Zool.*, 57: 1835-1844.
- Edmunds, M. 1968. Acid secretion in some species of Doridacea (Mollusca, Nudibranchia). *Proc. Malacol. Soc. London*, 38(2): 121-133.
- Farfan, B.C. & L.F.B. Ramirez. 1988. Spawning and ontogeny of *Bulla gouldiana* (Gastropoda: Opisthobranchia: Cephalaspidea). *Veliger*, 31: 114-119.
- Faulkner, D.J. & M.T. Ghiselin. 1983. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 13: 295-301.
- Gibson, G.D. 2003. Larval development and metamorphosis in *Pleurobranchaea maculata*, with a review of development in Notaspidea (Opisthobranchia). *Biol. Bull.*, 205: 121-132.
- Giese, A.C. & J.S. Pearse. 1974. Introduction. In: A.C. Giese & J.S. Pearse (eds.). *Reproduction of marine invertebrates*. Academic Press, New York, pp. 1-49.
- Gosliner, T. 1987. *Nudibranchs of Southern Africa*. Sea Challenger, Monterey, California, 135 pp.

- Hart, P.R., W.G. Hutchinson & G.J. Purser. 1996. Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862). *Aquaculture*, 144: 303-311.
- Häussermann, V. & G. Försterra. 2009. Fauna marina bentónica de la Patagonia Chilena: guía de identificación ilustrada. *Nature in Focus*, Santiago, 1000 pp.
- Krug, P. 2009. Not my "type": larval dispersal dimorphisms and bet-hedging in opisthobranch life histories. *Biol. Bull.*, 216: 355-372.
- Kubaneck, J., E.I. Graziani & R.J. Andersen. 1997. Investigations of terpenoid biosynthesis by the dorid nudibranch *Cadlina luteomarginata*. *J. Org. Chem.*, 62: 7239-7246.
- Liddy, G.C., F. Phillip & G. Maguire. 2004. Effect of temperature and food density on the survival and growth of early stages phyllosoma of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*. *Aquaculture*, 242: 207-215.
- Lalli, C.M. & R.J. Conover. 1973. Reproduction and development of *Paedoclione doliiformis*, and a comparison with *Clione limacine* (Opisthobranchia: Gymnosomata). *Mar. Biol.*, 19: 13-22.
- Lawrence, A.J. & J.M. Soame. 2004. The effects of climate change on the reproduction of coastal invertebrates. *Ibis*, 146(1): 29-39.
- Minagawa, M. & M. Murano. 1993. Effects of prey density on survival, feeding rate and development of zoea of the red frog crab *Ranina ranina* (Crustacea: Decapoda: Raninidae). *Aquaculture*, 113: 91-100.
- Minagawa, M. 1994. Effects of photoperiod on survival, feeding and development of larvae of the red frog crab, *Ranina ranina*. *Aquaculture*, 120(1-2): 105-114.
- Muniain, C., A. Marín & P.E. Penchaszadeh. 2001. Ultrastructure of the digestive gland larval and adult stages of the sacoglossan *Elysia patagonica*. *Mar. Biol.*, 139: 687-695.
- Pawlik, J.R. 2012. Antipredatory defensive roles of natural products from marine invertebrates. In: E. Fattorusso, W.H. Gerwick & O. Taglilatelata-Scarfati (eds.). *Handbook of marine natural products*. Springer, New York, pp. 677-710.
- Pawlik, J.R., M.R. Kernan, T.F. Molinski, M.K. Harper & D.J. Faulkner 1988. Defensive chemicals of the Spanish Dancer nudibranch, *Hexabranchnus sanguineus*, and its egg ribbons: macrolides derived from a sponge diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 119: 99-109.
- Pecl, G.T., M.A. Steer & K.E. Hodgson. 2004. The role of hatchling size in generating the intrinsic size-at-age variability of cephalopods: extending the Forsythe Hypothesis. *Mar. Freshwater Res.*, 55: 387-394.
- Perron, F.E. & R.D. Turner. 1977. Development, metamorphosis, and natural history of the nudibranch *Doridella obscura* Verrill (Corambidae: Opisthobranchia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 27: 171-185.
- Przeslawski, R. 2004. A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Molluscan Res.*, 24: 43-63.
- Rudman, W.B. 2000. *Aplysia oculifera* -larval development and metamorphosis. *Sea Slug Forum*. [<http://www.Seaslugforum.net/aplyocdev.htm>]. Reviewed: 25 June 2014.
- Schlesinger, A., R. Goldshmid, M.G. Hadfield, E. Kramarsky-Winter & Y. Loya. 2009. Laboratory culture of the aeolid nudibranch *Spurilla neapolitana* (Mollusca, Opisthobranchia): life history aspects. *Mar. Biol.*, 156: 753-761.
- Schrödl, M. 1996. Nudibranchia and Sacoglossa of Chile: external morphology and distribution. *Gayana Zool.*, 60(1): 17-62.
- Sokal, P. & J. Rohlf. 1969. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco, 775 pp.
- Sorte, C.J., S.J. Jones & L.P. Miller. 2011. Geographic variation in temperature tolerance as an indicator of potential population responses to climate change. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 400(1-2): 209-217.
- Thompson, T.E. 1966. Studies on the reproduction of *Archidoris pseudoargus* (Rapp) (Gastropoda Opisthobranchia). *Philos. T. R. Soc. Lond. B*, 250: 344-373.
- Todd, C.D. & R.W. Doyle. 1981. Reproductive strategies of marine benthic invertebrates: a settlement-timing hypothesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4: 75-83.
- Todd, C.D. & J.N. Havenhand. 1985. Preliminary observations on the embryonic and larval development of three dorid nudibranchs. *J. Moll. Stud.*, 51: 226-228.
- Uriarte, I., V. Espinoza, M. Herrera, O. Zúñiga, A. Olivares, P. Carbonell, S. Pino, A. Farías & C. Rosas. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 416-417: 168-175
- Valdés, A. & C. Muniain. 2002. Revision and taxonomic reassessment of Magellanic species assigned to *Anisodoris* Berg, 1898 (Nudibranchia: Doridoidea). *J. Mollus. Stud.*, 68: 345-351.
- Watt, J. & R. Aiken. 2003. Effect of temperature on development yime in egg masses of the intertidal Nudibranch, *Dendronotus frondosus* (Ascanius, 1774) (Opisthobranchia, Dendronotacea). *Northeast. Nat.*, 10(1): 17-24.
- Wolf, M. & C.M. Young. 2012. Complete development of the northeast Pacific Arminacean nudibranch *Janolus fuscus*. *Biol. Bull.*, 222(2): 137-149.
- Woods, H.A. & A.L. Moran. 2008. Temperature-oxygen interactions in Antarctic nudibranch egg masses. *Exp. Biol.*, 211: 798-804.



- Yang, Z. & Y. Chen. 2005. Effect of temperature on incubation period and hatching success of obscure puffer *Takifugu obscurus* (Abe) eggs. *Aquaculture*, 246: 173-179.
- Zagal, C. & C. Hermosilla. 2001. Guía de invertebrados marinos del litoral valdiviano. Quebecor World Chile, Santiago, 217 pp.
- Zimmerman, K. & J. Pechenik. 1991. How do temperature and salinity affect relative rates of growth, morphological differentiation, and time to metamorphic competence in larvae of the marine gastropod *Crepidula plana*? *Biol. Bull.*, 180: 372-386.

*Received: 28 August 2014; Accepted: 24 March 2016*