Trabajo presentado en la X Jornada de Ciencias del Mar, Santiago, mayo, 1990.

FECUNDACION Y DESARROLLO EMBRIONARIO DE **CHOROMYTILUS CHORUS** (MOLINA, 1782) (BIVALVIA, MYTILIDAE).

Pedro H. Toledo, Gilda Bellolio y Enrique Dupré*

ABSTRACT. Fertilization and embryonic development of **Choromytilus chorus** (Molina, 1782) (Bivalvia, Mytilidae).

Fertilization and embryonic development of the chilean giant mussel is described as seen by ligth and scanning electron microscopy.

The oocytes are released at first meiotic metaphase. They are irregularly shaped and become spheric after being in contact with sea water. Spermatozoa belong to the primitive type, consisting of an ovoid head with a conic acrosomal complex, a middle piece with 4 to 5 mitochondria and a tail.

At a temperature fluctuating between 18 to 20°C, the first polar body is formed at 30-60 minutes postfertilization (pf.) and the second polar body is formed at 65-70 minutes pf. Polar lobes are observed during the first three divisions. The cleavages are holoblastic and unequal. The first two divisions are vertical and the third cleavage is equatorial and spiral (dexiotropic). Succesive cleavages of the egg give rise to a ciliated sterroblastula at 4:05 h pf. Gastrulation occurs by epiboly and emboly simultaneously. The vitelline coat is present during all the embryonic development. The trocophore larvae are formed at 12 h pf. indicating the end of the embryonic stage.

Key words: Mytilids, fertilization, embryonic development.

INTRODUCCION

Choromytilus chorus es un mitílido gonocórico que presenta fecundación externa emitiendo sus gametos al agua de mar en donde ocurre la fecundación

* Universidad Católica del Norte, Sede Coquimbo. Casilla 117, Coquimbo, Chile.

(Lozada **et al.** 1971, Cortés 1978(1), Lozada & Santa Cruz 1979). **Ch. chorus** se distribuye en el océano Pacífico desde Callao en Perú hasta el estrecho de Magallanes y Canal Beagle en Chile (Osorio **et al.** 1979).

Los ovocitos de los moluscos bivalvos son desovados sin haber concluído su proceso meiótico (Longo 1976, Sastry 1979). En el caso de los mitílidos se ha reportado dos tipos de ovocitos primarios desovados: a) ovocitos en estado de profase meiótica con vesícula germinal (**Mytilus edulis**, Reverberi 1971, Bayne 1976 y **Choromytilus chorus**, Lozada **et al.** 1971, Cortés 1978); b) ovocitos en estado de primera metafase (**M. edulis**, Sastry 1979, Longo 1983).

Se ha reportado que la forma de los ovocitos recién desovados es irregular en **Choromytilus meridionalis** (Griffiths 1977), **Ch. chorus** (Cortés 1978) y **Mytilus edulis** (Bayne 1976, Mackie 1984) a causa de la compresión que experimentan en el interior de la gónada madura y después de ser liberados asumen la forma esférica. Sin embargo, Chaparro & Sanhueza (1986) y Bernard **et al.** (1988) señalan que **Ch. chorus** y **Brachidontes virgiliae** respectivamente, desovan ovocitos de forma esférica.

Los espermatozoides del tipo primitivo son característicos de especies cuya fecundación es externa como en la mayoría de los bivalvos (Jamieson 1987), y han sido descritos en los mitílidos **Choromytilus meridionalis**, **Mytilus galloprovincialis**, **Aulacomya ater** (Hodgson & Bernard 1986) y **Brachidontes virgiliae** (Bernard **et al.** 1988).

El primer evento en el proceso de fecundación es la interacción del espermatozoide con la cubierta del ovocito donde se produce la reacción acrosómica exponiendo el proceso acrosómico (Longo 1983). Luego ocurre la incorporación del espermatozoide dentro del ovocito el que reinicia la meiosis. Posteriormente se forman los pronúcleos y se condensa la cromatina (Longo 1983). En Mytilus edulis la superficie proximal de los pronúcleos masculino y femenino se contactan sin fusionarse, se condensan los cromosomas y simultáneamente se rompe la envoltura de ambos pronúcleos formándose la primera metafase mitótica (Longo 1983).

Estudios concernientes a etapas embrionarias en mitílidos se han realizado principalmente en **Mytilus edulis** y **Brachidontes virgiliae** (Prieur 1971 (2), Reverberi 1971, Bayne 1976). El conocimiento del desarrollo embrionario de **Choromytilus chorus** es escaso. Los estudios efectuados sobre el desarrollo temprano de esta especie se refieren principalmente a datos morfo-

(1) Cortés L., P. 1978. Cultivos experimentales de **Choromytilus** chorus en la IV Región. Informe Final, Sub-Proyecto del Centro de Investigaciones Submarinas Universidad del Norte, Coquimbo, 63 p.

(2) Prieur, D. 1971. Recherches bibliographiques sur le developpement embryonnaire des mollusques bivalves. Memoire d'etudes approfondies d'Oceanographie Biologique, Universite de Paris. 35 p.

métricos de las etapas larvales (Lozada et al. 1971, Chaparro & Sanhueza 1986), careciéndose de estudios detallados de su embriogénesis.

El objetivo del presente trabajo es describir la fecundación y el desarrollo embrionario de **Chorommytilus chorus**, con microscopía de luz y electrónica de barrido.

MATERIALES Y METODOS

Individuos adultos de **Choromytilus chorus** extraídos durante el mes de septiembre de 1989 desde Los Choros (20° 14'S, 71° 30'W), 120 km al norte de la ciudad de La Serena, se ubicaron en estanques de 30 l con agua de mar circulante a una temperatura que fluctuó entre 15 y 19°C y salinidad de 32 ppm, aireación constante y sobrealimentación diaria durante 30 días con microalgas **Isochrysis** sp. y **Chaetoceros** sp. Para inducir la emisión de gametos, los individuos se mantuvieron en seco a 4°C durante 8 h, luego se procedió a limpiar las valvas a temperatura ambiente con un cepillo y se pusieron en agua de mar microfiltrada y esterilizada con U.V. a 17°C en contenedores individuales de 1 l, donde la emisión de gametos se produce espontáneamente después de 1 a 1:30 h.

La concentración espermática utilizada en la inseminación fue de 7 espermatozoides por ovocito.

La mantención de embriones se realizó en recipientes de policarbonato de 50 l con agua de mar microfiltrada y esterilizada con U.V. La temperatura de los estanques osciló entre 18 y 20°C.

Gametos, obtenidos tanto desde el sifón exhalante como del medio, cigotos y embriones de **Choromytilus chorus** fueron fijados con Glutaraldehído al 2% según Turner & Boyle (1974) durante 48 h a 4°C, lavados en agua de mar microfiltrada y deshidratados en concentraciones crecientes de etanol. Una parte de las muestras fueron incluidas en glicol metacrilato JB-4 (Polysciences Inc., 1982), cortadas en secciones de 2-3 µm de grosor, teñidas con Azul de Metileno-Fucsina Básica ("tinción de Lee") y observadas en el microscopio de luz. El resto de las muestras, que fue preparada para la observación al microscopio electrónico de barrido (MEB), fueron secadas en un aparato de punto crítico con CO2 líquido como medio intermediario, cubiertas con oro en una sombreadora JEOL JFC-1100 y analizadas en un MEB JEOL JSM T-300.

Con el propósito de determinar la presencia de vesícula germinativa y membrana de fecundación se analizaron 460 secciones de ovocitos recién desovados, sin fecundar y 300 secciones de ovocitos fecundados respectivamente.

RESULTADOS

Los ovocitos de **Choromytilus chorus** son desovados en estado de primera metafase meiótica. Su forma en el momento del desove es irregular y adquiere forma esférica con un diámetro promedio de 67.1 ± 5.4 µm (N = 30), 30 a 60 segundos después de entrar en contacto con el agua de mar. Presenta una cubierta vitelina de 1.5-2 µm de espesor con textura externa granular (Fig. 1, 2 y 7).

Los espermatozoides son del tipo primitivo (Fig. 1): la cabeza con 4 um de longitud presenta núcleo ovoide y un acrosoma de forma cónico. La pieza media contiene 4 a 5 mitocondrias de 1 um de diámetro cada una y el flagelo tiene una longitud de 43 µm.

A partir de los 5 min de realizada la inseminación se observó espermatozoides reaccionados con el proceso acrosómico expuesto en forma de tallo sobre la cubierta vitelina de los ovocitos (Fig. 2). No se observó reacción cortical ni membrana de fecundación. Los ovocitos primarios reinician la meiosis después de la interacción ovocito - espermatozoide produciéndose dos polocitos y un pronúcleo femenino (Fig. 3). El primer polocito se libera entre los 30 min y 1 h post-fecundación (pf.) y el segundo entre 1:05-1:10 h pf.

Entre las 1:10 y 1:20 h pf. se produce el contacto de los pronúcleos masculino y femenino sin producirse la fusión de sus membranas. Ambos están desplazados levemente hacia el polo animal (Fig. 3). Con la liberación del segundo polocito, entre 1:05-1:10 h pf., se segrega el primer lóbulo polar en el polo vegetativo del embrión (Fig. 4) y es reabsorbido antes de la primera segmentación.

Al inicio de la primera división de segmentación que ocurre a partir de 1:20 h pf. se observa el segundo lóbulo polar quedando el embrión en estado de "trébol" y éste se reabsorbe en el blastómero CD (Fig. 5).

El primer surco de segmentación es meridional y total, iniciándose en el polo animal entre 1:20 y 1:35 h pf. Se producen dos blastómeros AB y CD, siendo este último de mayor tamaño que el blastómero AB debido a la incorporación del segundo lóbulo polar.

El segundo surco de segmentación que es meridional, total y con un leve ángulo respecto al primero, aparece en el polo animal entre 1:50 - 2:05 h pf. y va acompañado del tercer y último lóbulo polar observado. Esta segmentación origina 3 blastómeros equivalentes en tamaño (blastómeros A, B, C) y uno de mayor dimensión (blastómero D) debido a la incorporación del tercer lóbulo polar. Por el carácter espiral de la segunda segmentación los blastómeros A y C se contactan hacia el polo animal mientras que los blastómeros B y D lo hacen hacia el polo vegetativo.

El tercer surco de segmentación aparece entre 2:00 y 2:30 h pf. Es supraecuatorial y en espiral y origina una mórula de 8 blastómeros: 4 micrómeros en el polo animal ubicados sobre los límites de los macrómeros y despla-

zados en sentido horario o dexiotrópicamente y 4 macrómeros en el polo vegetativo.

Después de esta segmentación se pierde la sincronía de las divisiones, observándose entre 2:40-3:05 h pf. una mórula con 12 blastómeros.

La blástula aparece a las 3:30 h pf. y finaliza a las 7:00 h pf. con el inicio de la gastrulación. **Choromytilus chorus** presenta una blástula del tipo esteroblástula (Fig. 6). A las 4:05 h pf. se evidencia la presencia de cilios en una disposición regular que señalan la ubicación de 16 trocoblastos primarios distribuidos en 4 regiones supraecuatoriales y equidistantes entre sí (Fig. 7). Los poliocitos están presentes sólo hasta esta etapa (Fig.8).

La gastrulación en Choromytilus **chorus** se genera por epibolía y emboIía. Los micrómeros o ectómeros envuelven a los macrómeros que luego al invaginarse se denominarán endómeros. En corte transversal se observa un espacio interblastomérico (Fig. 9), y los embriones en esta etapa poseen un leve movimiento rotatorio indicando el final de la etapa embrionaria. La cubierta vitelina se mantiene durante todo el desarrollo embrionario.

DISCUSION

Choromytilus chorus presenta espermatozoides morfológicamente similares con los mitílidos **Ch. meridionalis, Mytilus galloprovincialis** y **Aulacomya ater** (Hodgson & Bernard 1986).

Los diámetros de los ovocitos desovados determinados en el presente estudio no coinciden con los obtenidos por Cortés (1978) cuyos registros oscilaron entre 54 y 89 um de diámetro ni con Lozada **et al.** (1971) quienes señalan que el diámetro medio de los ovocitos desovados fue de 52 µm. Estas diferencias podrían deberse a variaciones interpoblacionales como se ha reportado en **Pecten maximus** (Paulet **et al.** 1988) donde los ovocitos desovados de la población de bahía St. Brieuc son de mayor dimensión en comparación a los ovocitos desovados en bahía Brest. Otra explicación posible para esta diferencia en el tamaño de los ovocitos podría ser la época del año en que se realizaron los desoves como señalan Kraeuter **et al.** (1982) quienes encuentran diferencias intraespecíficas significativas en el tamaño de los ovocitos desovados en diferentes épocas del año de **Mercenaria mercenaria.**

Cortés (1978) y Lozada **et al.** (1971) observaron vesícula germinativa en los ovocitos recién desovados, sin embargo en el presente estudio no se reconoció núcleo profásico en observaciones de ovocitos recién desovados ni en secciones histológicas de éstos. Al igual que **Mytilus edulis** (Sastry 1979, Longo 1983) los ovocitos de **Choromytilus chorus** son desovados en primera metafase meiótica.

Cortés (1978) señala que los ovocl-

tos de **Choromytilus chorus** post-fecundación presentan membrana de fecundación, lo cual no fue observado en ninguno de los cortes de ovocitos fecundados analizados. Esto coincide con lo señalado por Raven (1966) para pelecípodos en general y Longo (1983) para **Mytilus edulis**.

La morfología del ovocito primario de **Choromytilus chorus** en el momento mismo del desove resulta comprimida, coincidiendo con lo señalado por Cortés (1978) para esta misma especie, por Bayne (1976) para **Mytilus edulis**, por Griffiths (1977) para **Choromytilus meridionalis** y **Aulacomya ater** y por Mackie (1984) para bivalvos en general. El contacto con el agua provoca el cambio morfológico en el ovocito de **Ch. chorus** el que asume la forma esférica a los pocos segundos (30 a 60 segundos). Chaparro & Sanhueza (1986) señalan que los ovocitos recién desovados de esta especie son esféricos, lo que hace suponer que la observación fue realizada 1 min después del desove.

La interacción de los gametos masculino y femenino poroduce entre las 1:10 y 1:20 h pf. la formación de los pronúcleos de ambos gametos, los cuales no se fusionan como en otros pelecípodos (Kume & Dan 1968, Sastry 1979), sino que ocurre un estrecho acercamiento de los pronúcleos similar a **Mytilus edulis** y **Spisula** (Longo 1983).

Posteriormente ocurre la condensación de los cromosomas y rompimiento de las membranas pronucleares, permitiendo la organización de los cromosomas maternos y paternos en el primer huso mitótico finalizando así el proceso de fecundación.

El tiempo que demora el embrión en cada una de las etapas del desarrollo depende en gran medida de la temperatura del medio, a una mayor temperatura el desarrollo temprano se acelera (Loosanoff & Davies 1963, Sastry 1979, Chaparro & Sanhueza 1986). A la temperatura de 19 ± 1ºC el presente estudio determinó que el desarrollo embrionario del **Choromytilus chorus** demora 12 h desde la primera segmentación hasta la aparición de la larva trocófora, mientras que Chaparro & Sanhueza (1986) señalan que a 16.5 ± 0.5ºC de temperatura el tiempo requerido es 19 h para la misma especie, ratificando la hipótesis planteada por diversos autores anteriormente. Sería necesario determinar el tiempo que demora el desarrollo embrionario a diferentes temperaturas a fin de estandarizar estos resultados y cuantificar la importancia de este factor abiótico en la embriogénesis.

LITERATURA CITADA

Bayne, B.L. 1976. The biology of mussel larvae. In: B.L. Bayne (ed). Marine mussels their ecology and physiology. pp. 81-120. Cambridge University Press, Cambridge.

Bernard, R.T.F., Davies, B.R. & A.N. Hodgson. 1988. Reproduction in a Brackish-Water Mytilid: Gametogenesis and Embryonic Development. The Veliger, 30 (3): 278-290.

Chaparro, O.R. & M.A. Sanhueza. 1986. Desarrollo embrionario y larval del choro zapato **Choromytilus chorus** (Bivalvia, Mytilidae). Biología Pesquera, 15: 75-79.

Griffiths, R.J. 1977. Reproductive cycles in littoral populations of **Choromytilus meridionalis** (Kr) and **Aulacomya ater** (Molina) with a quantitative assessment of gamete production in the former. Journal Experimental Marine Biology and Ecology, 30: 53-71.

Hodgson, A.N. & R.T.F. Bernard. 1986. Ultraestructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca, Bivalvia). Gamete Research, 15: 123-135.

Jamieson, B.G.M. 1987. A biological classification of sperm types, with spetial reference to annelids and molluscs, and a example spermiocladistics. In: H.Rohri (ed). New Horizons in Sperm Cell Research. Japan Scientific Societes Press pp: 311-332.

Kraeuter, J.N., Castagna, M. & R. vand Dessel. 1982. Egg size and larval survival of **Mercenaria mercenaria** (L.) and **Argopecten irradians** (Lamarck). Journal Experimental Marine Biology and Ecology, **56**: 3-8.

Longo, F.J. 1976. Ultraestructural aspects of fertilization in spiralian eggs. American Zoological, **16**: 375-394.

Longo, F.J. 1983. Meiotic maturation and fertilization. In: Karl Wilbur (ed), The Mollusca, 3: 49-89.

Loosanoff, V.L. & H.C. Davies. 1963. Rearing of bivalve molluscs. Advance Marine Biology, 1: 1-136.

Lozada, E., Rolleri, J. & R. Yáñez. 1971. Consideraciones biológicas de **Choromytilus chorus** en dos sustratos diferentes. Biología Pesquera, Chile, 5: 61-108.

Lozada, E. & S. Santa Cruz. 1979. Choro zapato, **Choromytilus chorus** (Molina). Lamellibranchia, Anisomyaria, Mytilidae. En: Corporación de Fomento y de la Producción, IFOP, Chile (eds). Estado Anual de las Principales Pesquerías Nacionales, Bases para un Manejo Desarrollo Pesquero. Moluscos (3).

Mackie, G.L. 1984. Bivalves. In: Tompa A.S., Verdonk, N.H. & J.A.M. van den Biggelar (eds). The Mollusca: Reproduction 7: 351-402. Academic Press, Orlando.

Osorio, C., Atria, J. & S. Mann. 1979. Moluscos marinos de importancia económica en Chile. Revista de Biología Pesquera, Chile, 11: 3-47.

Paulet, Y.M., Lucas, A. & A Gerard. 1988. Reproduction and development in two **Pecten maximus** (L.) populations from Brittany. Journal Experimental Marine Biology and Ecology, **119**: 145-156.

Raven, CHR. P. 1966. Morphogenesis: The analysis of molluscan development. Maturation and fertilization pp. 22-57. Pergamon Press, London.

Reverberi, G. 1971. **Mytilus**. In: G. Reverberi (ed). Experimental embriology of marine and fresh water invertebrates. pp. 176-187. North-Holland Publ. Co.

Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese, A.C. & J.S. Pearse (eds). Reproduction of Marine Invertebrates, 5: 113-265. Academic Press, New York.

Turner, R.D. & P.J. Boyle. 1974. Studies of bivalve larvae using the scanning electron microscope and critical point drying. Bulletin American Malacological Union: 59-65.

Manuscrito recibido en agosto de 1990 y aceptado en octubre de 1990.

Fig. 1. Espermatozoide de **Ch. chorus** visto al MEB, presenta acrosoma (A), núcleo (N), mitocondrias (M) y flagelo (F). Nótese la textura de la cubierta vitelina (MV). Barra = 1 µm.

Fig. 2. Espermatozoides reaccionados de **Ch. chorus**, vistos al MEB, sobre cubierta vitellina del ovocito (MV), proceso acrosomal expuesto (PA). Barra = 1µm.

Fig. 3. Corte a través de un ovocito fecundado observado a microscopía de luz, 1:10 h pf. Primer polocito (P1), segundo polocito (P2), pronúcleo femenino (PF), pronúcleo masculino (PM) y polo vegetativo (PV). Barra = 20 µm.

Fig. 4. Primer lóbulo polar (1L) visto al MEB. Barra = 20 µm.

Fig. 5. Embrión en estado de "trébol", visto al MEB, 2º lóbulo polar (2L), blastómeros AB y CD. Barra = 20 µm.

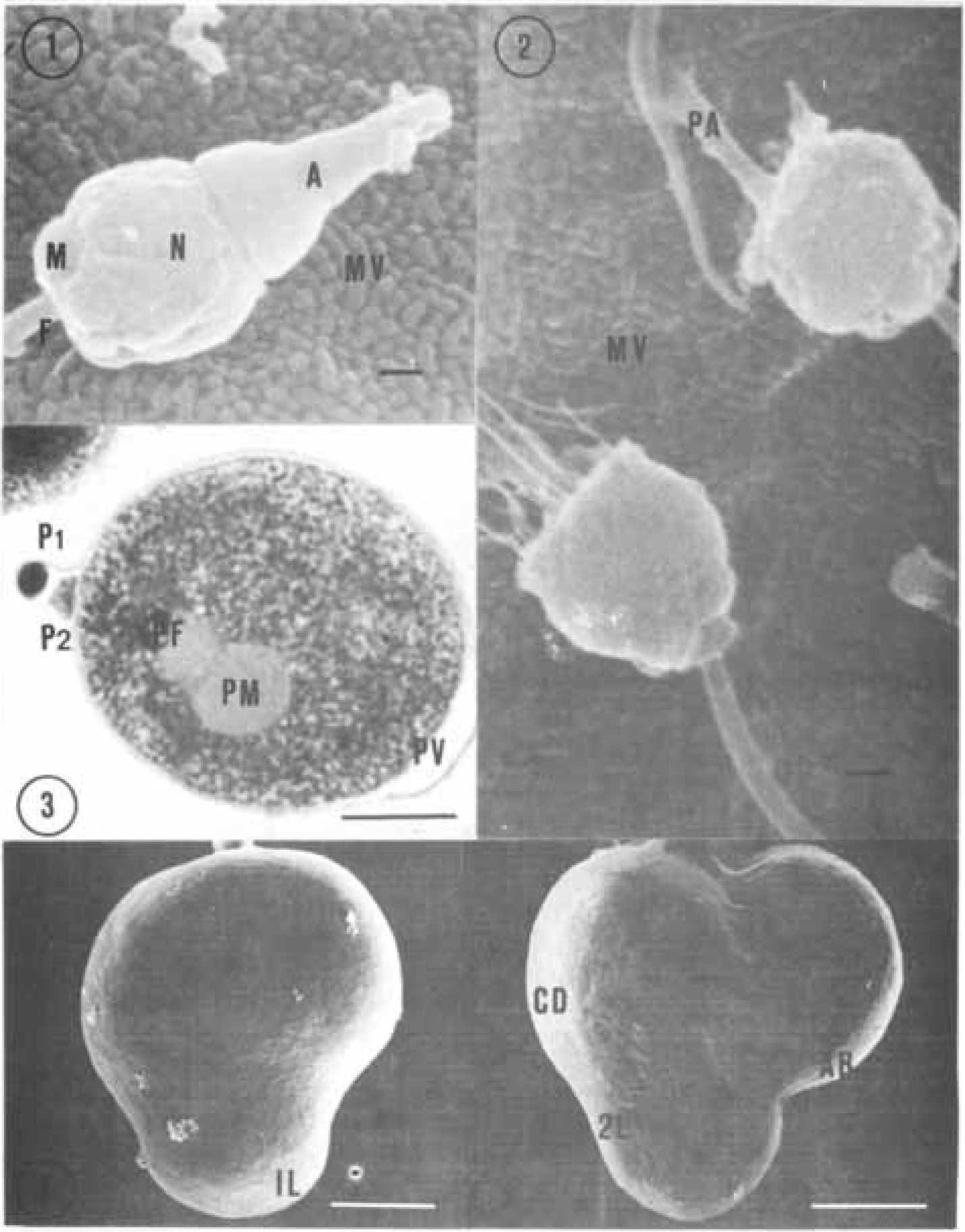
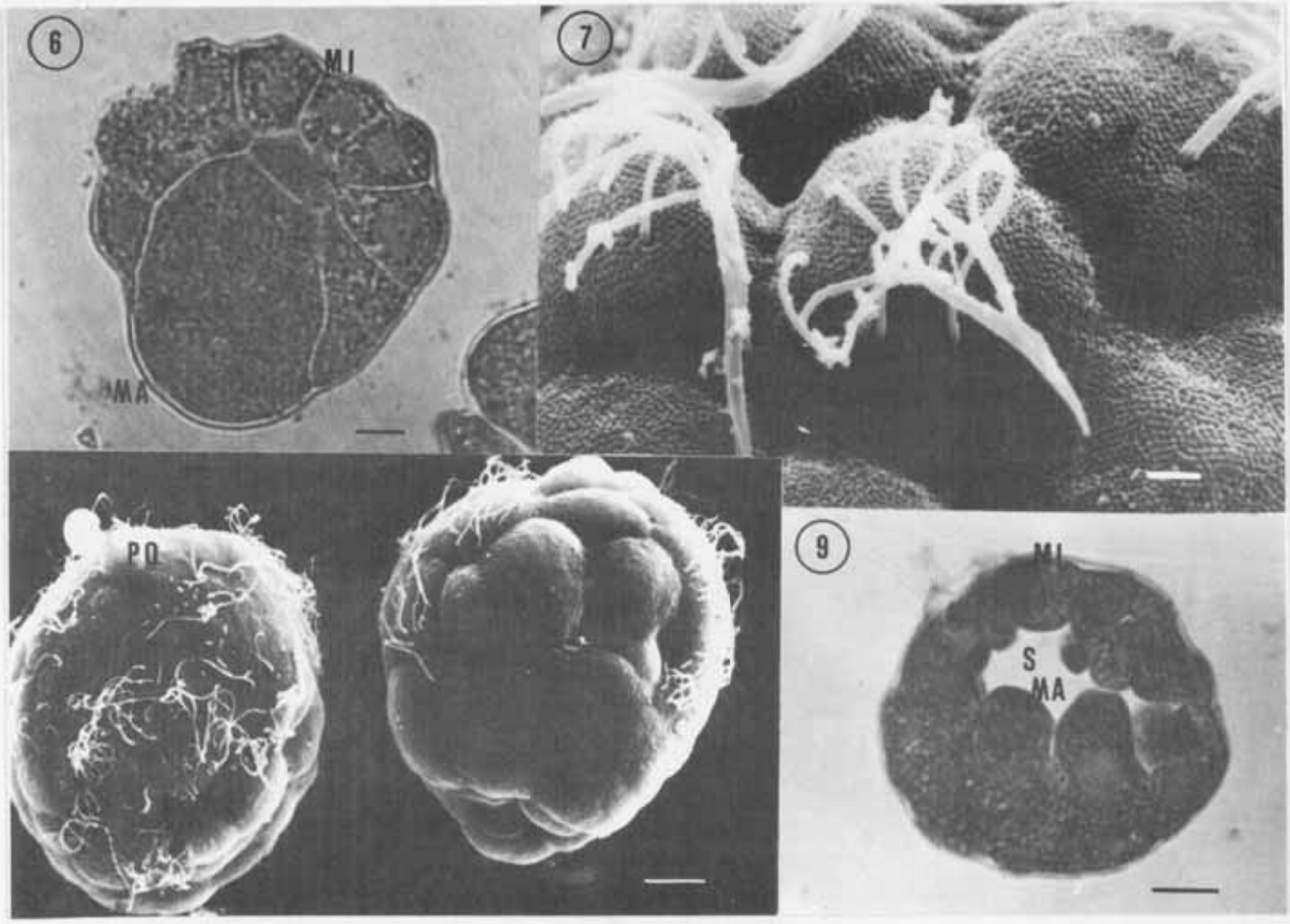

1
A
M
N
MV
F
2
PA
MV
P1
P2
PF
PM
PV
3
IL
CD

Fig. 6. Estereoblástula seccionada observada a microscopía de luz, 4 h pf. Micrómeros (MI) y macrómeros (MA). Barra = 10 µm.

Fig. 7. Los 4 trocoblastos primarios, vistos al MEB, iniciando la ciliación, 4:05 h pf., note la cubierta vitelina. Barra = 12 µm.

Fig. 8. Blástula ciliada y polocitos (PO), 6 h pf, vistos al MEB. Barra = 12 µm.

Fig. 9. Gástrula seccionada observada a microscopía de luz, 7 h pf. Micrómeros (MI), macrómeros (MA) y espacio interblastomérico (S). Barra = 12 µm.


6
MI
MA
7
PO
9
MI
S
MA