



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**ASOCIACIÓN TEMPORAL DEL DESARROLLO  
EMBRIONARIO Y LARVARIO CON LOS CICLOS  
OVÁRICO Y DE MUDA DEL EUFÁUSIDO**  
*Nyctiphanes simplex* HANSEN, 1911

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

DELLIS MONTUY GÓMEZ

LA PAZ, B.C.S., Junio 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**“ASOCIACIÓN TEMPORAL DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO  
CON LOS CICLOS OVÁRICOS Y DE MUDA DEL EUFÁUSIDO *Nyctiphanes simplex* Hansen, 1911”**

Presentada por el alumno:

**MONTUY**  
Apellido paterno

**GÓMEZ**  
materno

**DELLIS**  
nombre(s)

Con registro: 

A	0	9	0	1	3	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

  
DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ  
Director de Tesis

  
MC. MA. DEL CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO  
Director de Tesis

  
DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

  
MC. JOSÉ RICARDO PALOMARES GARCÍA

  
DR. GERARDO ACEVES MEDINA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**IPN  
CICIMAR  
DIRECCION**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 11 del mes Mayo del año 2011  
el (la) que suscribe BM. DELLIS MONTUY GÓMEZ alumno(a) del  
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS  
con número de registro A090136 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ y MC. MARÍA DEL CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO  
y cede los derechos del trabajo titulado:

“ASOCIACIÓN TEMPORAL DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO CON LOS CICLOS  
OVÁRICOS Y DE MUDA DEL EUFÁUSIDO *Nyctiphanes simplex* Hansen, 1911”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: dmontuy@hotmail.com - jgomezgu@gmail.com - jaramilo04@cibnor.mx  
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. DELLIS MONTUY GÓMEZ  
nombre y firma

*Dedico esta Tesis a mi esposo Raúl, a  
nuestra hija Andrea, Pandita II,  
y a mis padres Paulina y José.*

Gracias Raúl por todo tu amor y apoyo a lo largo de estos años, soy feliz por poder compartir mis sueños y metas a tu lado. Te amo. Gracias Andrea por ser la niña linda que tanto esperábamos, por tus besitos y tus abrazos que me dan la fuerza para seguir adelante. A pandita II por soportar tanto estrés y aún así estar bien.

Finalmente, gracias a mis padres por las bases que me dieron y los valores que me enseñaron. Sin todo eso, no sería quién soy ahora. Los quiero mucho.

"La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante". Paulo Coelho

"La ciencia ha cumplido su función cuando ha averiguado y enunciado una verdad." T. E. Huxley

"Cuando se sabe una cosa, sostener que se sabe, y cuando no se sabe, admitir que no se sabe; éste es el verdadero conocimiento." Confucio

"El conocimiento es el alimento del alma." Platón

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue parcialmente financiada por el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional con el proyecto de investigación institucional de la SIP-IPN titulado Síntesis de la biología y ecología de los eufáusidos 2008-2010 (20070279, 20080490, 20090090, 20100173), el proyecto SEMARNAT-CONACyT Monitoreo de la producción secundaria, dinámica poblacional y parasitismo de especies claves del zooplancton mediante incubaciones *in situ* y métodos hidroacústicos en el Golfo de California (SEMARNAT-2004-C01-01-144), el proyecto SAGARPA-CONACyT Ecología de crustáceos galatheidos (fase pelágica) e ictioplancton con énfasis en especies béntico-demersales en el Golfo de California (SAGARPA S007-2005-1-11717) y la Universidad Nacional Autónoma de México con los proyectos de investigación 'Cardumenes de peces pelágicos menores en el Golfo de California' (CAPEGOLCA) (PAPIIT IN219502 y IN210622).

Asimismo agradezco la beca de estudios de posgrado de CONACyT y el apoyo económico del IPN por medio del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) enmarcado en el proyecto Síntesis de la biología y ecología de los eufáusidos. Al Dr. Carlos Robinson Mendoza (ICMyL-UNAM), la tripulación del B/O El Puma; estudiantes, particularmente Samuel Martínez Gómez que preservó en Karnovsky y Davidson muchas de las muestras de esta tesis y científicos del Laboratorio de Ecología de Pesquerías del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (ICMyL-UNAM) y CICIMAR por su cooperación en la recolección de registros de datos oceanográficos durante los cruceros CAPEGOLCA realizados en Julio de 2007, Marzo y Octubre 2010.

Mi mayor agradecimiento y aprecio para Jaime Gómez Gutiérrez, María del Carmen Rodríguez Jaramillo y María Eulalia Meza Chávez, gracias por su apoyo, enseñanzas, consejos y paciencia durante este largo proceso. Sin ustedes esta tesis no podría haber sido realizada.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RELACIÓN DE CUADROS, GRÁFICAS E ILUSTRACIONES .....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>II</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN:.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
TRABAJO DE CAMPO.....	15
ANÁLISIS HISTOLÓGICOS .....	17
<i>Cortes en parafina.</i> .....	18
<i>Cortes en resina.</i> .....	18
HISTOLOGÍA CUANTITATIVA Y CUALITATIVA .....	19
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
MORFOLOGÍA Y BIOMETRÍA DE LOS EMBRIONES .....	22
DESARROLLO EMBRIONARIO EN EL SACO OVÍGERO .....	23
DESARROLLO LARVARIO EN EL SACO OVÍGERO Y FORMACIÓN DE TEJIDOS .....	28
PROPORCIÓN DE LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS EN EMBRIONES Y LARVAS.....	36
PROCESO DE MUDA DE LAS LARVAS DENTRO DEL SACO OVÍGERO DE LAS HEMBRAS.....	37
PROCESO DE MUDA DE LAS HEMBRAS OVÍGERAS .....	38
MODELO CONCEPTUAL DE LA INTERACCIÓN TEMPORAL ENTRE LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS, DESARROLLO LARVARIO DENTRO DEL SACO OVÍGERO CON EL CICLO DE MUDA Y OVOGÉNESIS DE LA HEMBRA OVÍGERA. ....	41
<b>ANÁLISIS .....</b>	<b>44</b>
DESARROLLO EMBRIONARIO DENTRO DEL SACO OVÍGERO .....	44
DESARROLLO LARVARIO .....	49
MUDA DE LA HEMBRA OVÍGERA .....	54
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO.....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## RELACIÓN DE CUADROS, GRÁFICAS E ILUSTRACIONES

<b>Tabla 1.</b> Estadios de desarrollo embrionario de los eufáusidos con estrategia reproductiva de desove externo y con saco ovífero. ....	6
<b>Figura 1.</b> Fotografías del desarrollo embrionario y larvario temprano en el saco ovífero de <i>N. simplex</i> . ....	7
<b>Figura 2.</b> Cortes histológicos longitudinales de las gónadas femeninas del eufáusido <i>N. simplex</i> . ....	10
<b>Figura 3.</b> (A) B/O El Puma, (B) Área de estudio. (C) Red de deriva. ....	16
<b>Figura 4.</b> Fotografía de macho con espermátforo extruído y hembra ovígera de eufáusido <i>N. simplex</i> . ....	17
<b>Figura 5.</b> A) Fotografía del microtomo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems) y B) digitalización de imágenes de embriones y hembras de <i>N. simplex</i> con el Sistema de Análisis Digital de Imágenes (Image Pro-Plus v.4.1). ....	19
<b>Figura 6.</b> <i>N. simplex</i> . Hembra (A) grávida y (B) ovígera en los primeros estadios embrionarios. ....	21
<b>Figura 7.</b> Biometría de de los estadios de desarrollo embrionario y larvario en el saco ovífero de <i>Nyctiphanes simplex</i> . ....	23
<b>Figura 8.</b> Desarrollo embrionario de <i>N. simplex</i> desde la primera división celular hasta antes de la eclosión del nauplio en estadio tardío de apéndices. ....	27
<b>Figura 9.</b> Desarrollo de los estadios larvarios nauplio, pseudometanauplio y metanauplio de <i>Nyctiphanes simplex</i> , ubicados en el saco ovífero. ....	31
<b>Figura 10.</b> Cortes histológicos de larva caliptopis 1, 2 y 3 de <i>N. simplex</i> . ....	35
<b>Figura 11.</b> Proporción de lípidos y carbohidratos en embriones y larvas de <i>N. simplex</i> . ....	36
<b>Figura 12.</b> Estadios de muda de hembras ovígeras de <i>N. simplex</i> . ....	40
<b>Figura 13.</b> Grosor de la cutícula de las hembras durante los estadios de desarrollo del embrión y larvas en su saco ovífero. ....	42
<b>Figura 14.</b> Modelo conceptual de la asociación de los procesos de desarrollo embrionario y los ciclos gonádico y de muda de las hembras de <i>N. simplex</i> . ....	43

## ABREVIATURAS

**1C** = Una célula  
**a1** = Primera antena  
**a2** = Segunda antena  
**abd** = Abdomen  
**an** = Zona anterior  
**ap** = Apéndices  
**axn** = Axones  
**Bla** = Blástula  
**C1** = Caliptopis 1  
**C3** = Caliptopis 3  
**cf** = Células foliculares  
**cFh** = Células F de I hepatopáncreas  
**cfx** = cefalotórax  
**cn** = Células nerviosas  
**cnc** = Cordón nervioso central  
**cne** = Cordón nervioso  
**cnn** = Células nerviosas neuro-secretoras  
**cr** = Cromatina  
**cRh** = células R del hepatopáncreas  
**co** = Corion  
**ct** = Citoplasma  
**cu** = Cutícula  
**do** = Zona dorsal  
**e** = Espina  
**ec** = Ectodermo  
**ed** = Endocutícula  
**edd** = Endodermo  
**Etaa** = Estadio de desarrollo tardío de apéndices  
**Etea** = Estadio de desarrollo temprano de apéndices  
**ex** = Exocutícula  
**gd** = Glándula digestiva  
**gl** = Glóbulo Lipídico  
**glo** = Células globulares  
**h** = Horas  
**hlf** = Hemolinfa  
**HN** = Huevos nauplio  
**in** = Intestino  
**lb** = Labrum  
**lc** = Lóbulo de la cabeza  
**lum** = Lumen  
**m** = Músculo  
**md** = Mandíbula  
**mc** = Membrana citoplasmática

**MC** = Múltiples células  
**me** = Mesodermo  
**MN** = Metanauplio  
**mx** = Máxila  
**mxl** = Máxilula  
**mv** = Borde de microvellosidades  
**n** = Núcleo  
**N** = Nauplio  
**nc** = Nucleolo  
**ncu** = nucleolo  
**nep** = nueva epicutícula  
**nex** = nueva exocutícula  
**Oc (1,2,3,4,5,6)** = Ovocitos en subestadios  
**PAS** = Ácido Periódico de Schiff  
**pc** = papila caudal  
**pgd** = Primordio glándula digestiva  
**pi** = Primordio de intestino  
**PIP**= Periodo de Interpuesta  
**PMN** = Pseudometanauplio  
**PNR** = Punto de No Retorno  
**po** = Zona posterior  
**poi** = Posible intestino  
**pro** = Procutícula  
**set** = Setas  
**sg** = Segmento de ganglio  
**tel** = Telson  
**to** = Toracópodos  
**vac** = Vacuolas  
**vcu** = Vieja cutícula  
**ve** = Zona ventral  
**ved** = Vieja endocutícula  
**vi** = Vitelo

## GLOSARIO

**Anafase** = Proceso de la meiosis en el cual las cromátidas hermanas se separan y las nuevas se mueven hacia polos opuestos de la célula.

**Apólosis** = Proceso de separación del viejo exoesqueleto de la epidermis de artrópodos produciendo un espacio entre ambos; el cual posteriormente se desarrollara y será remplazado por un nuevo exoesqueleto.

**Blastocele** = Es la región central de la blástula; Este se forma cuando el cigoto sufre el proceso de segmentación, mediante repetidas mitosis, da lugar a la mórula, ésta se ahueca y origina la blástula con la mencionada cavidad central.

**Blastómeros** = células animales indiferenciadas resultantes de la segmentación del cigoto.

**Blástula** = Estadio temprano del desarrollo embrionario en los animales; sigue a la mórula y precede a la gástrula en la secuencia de desarrollo normal de cualquier animal; se considera que el organismo está en estadio blástula cuando el embrión presenta más de 64 células cuando adquiere dos capas germinales (ectodermo y endodermo).

**Caliptopis** = Estadio larvario característico de los crustáceos del Orden Euphausiacea que se desarrolla después del estadio metanauplio caracterizado por el desarrollo del caparazón, el alargamiento y diferenciación del abdomen y la aparición de los ojos compuestos localizados debajo del caparazón.

**Ciclo de muda** = Tiempo en el cual un organismo renueva el integumento que recubre el exterior del cuerpo, esto ocurre bajo control hormonal.

**Corión** = Membrana o envoltura externa que recubre al embrión.

**Crustáceos** = Extenso subfilo de artrópodos que comprende más de 67,000 especies. Incluyen las langostas, los camarones, los cangrejos, los langostinos y los percebes. Las especies de esta subfilo son acuáticas, habitan en todas las profundidades del medio marino, salobre y de agua dulce; unos pocos han

colonizado el medio terrestre como los isópodos y brachiuros. Como característica propia y definitoria del grupo podemos citar la presencia de larva nauplio. Son los únicos artrópodos con dos pares de antenas, tienen al menos un par de máxilas y pasan por períodos de muda e intermuda para crecer.

**Ecdisis** = El proceso de desprendimiento del viejo exoesqueleto denominado también proceso de muda.

**Embriogénesis** = proceso de la formación y el desarrollo de un embrión.

**Embrión** = Etapa inicial de desarrollo ontogenético definido como un huevo fertilizado.

**Eufáusido** = crustáceos malacostracos del Orden Euphausiacea exclusivamente marinos y principalmente pelágicos, presentan las branquias expuestas no cubiertas por el caparazón y tienen dos estadios de desarrollo únicos del grupo: caliotopis y furcilia.

**Exoesqueleto** = Integumento quitinoso o calcificado que cubre la parte exterior del cuerpo y los apéndices de los Artrópodos.

**Furcilia** = Estadio larvario característico de los eufáusidos que se desarrolla después de la fase caliotopis que se caracteriza por presentar ojos compuestos móviles que se proyectan más allá del borde del caparazón, se desarrollan los cinco segmentos abdominales (plepodos) en estadios tempranos furcilia, se va disminuyendo el número de espinas del telson de siete a una en distintos subestadios fucilias.

**Gástrula** = Estadio de desarrollo embrionario que sigue al estadio embrionario de blástula. Este estadio se caracteriza por una reestructuración de la célula (denominada gastrulación) el cual es el proceso formativo del embrión cuando adquiere tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y adquiere una orientación axial.

**Krill** = nombre común proveniente del noruego, que significa alimento de ballenas, con el que se conoce a las especies de crustáceos del Orden Euphausiacea,

aunque este nombre fue inicialmente aplicado a *Megnyctiphanes norvegica* y posteriormente generalizado para nombrar a la especie Antártica *E. superba* con significativa importancia comercial, es posible generalizar este nombre común a las 86 especies existentes en este Orden.

**Larva** = Fase de desarrollo posterior a la fase embrionaria y que precede a la fase juvenil de organismos con desarrollo indirecto que requieren diversas transformaciones morfológicas mediante el proceso de metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y en ocasiones habitan en distinto hábitat que en las fases juvenil y adulto.

**Lecitotróficos** = Embriones que reciben nutrientes desde la yema del huevo.

**Metanauplio** = Estadio larvario que se desarrolla posterior al estadio nauplio y antes del estadio caliptopis que se caracteriza por el desarrollo del labrum y los rudimentos de maxillulas, maxila superior y primer par de toracópodos.

**Muda** = Proceso en el que varios animales como artrópodos y reptiles se liberan de un viejo exoesqueleto o piel e incrementan de talla antes de que la nueva cutícula se endurezca.

**Nauplio** = Larva de forma ovalada caracterizada por presentar tres pares de apéndices: antenulas, antenas y mandíbulas. Dependiendo de la especie, este estadio de desarrollo puede ocurrir en el periodo embrionario (dentro del corion) ó propiamente como larva de vida libre.

**Ovocito** = Célula germinal femenina que está en proceso de convertirse en un óvulo maduro.

**Ovogénesis** = Proceso de formación de las células sexuales femeninas, desde la oogonia hasta el óvulo.

**Organogénesis** = Proceso de formación y cambios morfológicos que permiten que las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) se transformen en los diferentes órganos y estructuras del cuerpo que conforman un organismo.

**Previtelogénesis** = Proceso anterior a la formación de los materiales de reserva del citoplasma del embrión.

**Pseudometanauplio** = Estadio larvario posterior a nauplio y anterior al metanauplio caracterizado por presentar dos pares de apéndices funcionales (primer y segunda antena), las mandíbulas son reducidas pero funcionales como apéndices natatorios. La primera y segunda maxila y los maxilípedos están presentes, el abdomen aún es corto.

**Punto de No Retorno (PNR)** = Tiempo límite de carencia de alimento (ayuno) a partir del cual aun en presencia o disponibilidad de alimento ya no se restituyen las capacidades físicas de las larvas que resulta inevitablemente en muerte por inanición.

**Sacos ovígeros** = En el caso de los eufáusidos se refiere a un par de sacos membranosos asimétricos en los cuales las hembras cargan y protegen a sus embriones.

**Segmentación en división total** = División celular en la cual los blastómeros son completamente separados; y el huevo entero participa en la división celular.

**Segmentación holoblástica** = que desarrolla segmentación completa compuesta completamente por la masa germinal y todo el vitelo entra en fisión (opuesto a segmentación meroblástica).

**Segmentación meroblástica** = segmentación del cigoto que se desarrolla solamente en parte de la materia germinal, caracterizado únicamente por una segmentación parcial (opuesto a segmentación holoblástica).

**Tritocerebro** = Uno de los tres pares de lóbulos del cerebro de los crustáceos, el cual se conecta con el ganglio subesofágico que inerva las mandíbulas, maxilas y labrum. Resultado de la fusión de un par de ganglios; en origen es postoral.

**Zooplankton** = Organismos heterótrofos que viven en la columna de agua (ambiente pelágico) que derivan con las corrientes marinas debido a su relativamente limitada capacidad de natación.

## RESUMEN:

La embriología de los eufáusidos se ha estudiada sólo en especies con estrategia de desove externo de regiones zoogeográficas templadas y polares, las cuales aparentemente tienen sincronizados sus ciclos de desarrollo gónadico y de muda. En el pasado se ha asumido que las especies con desove en saco ovífero tienen un desarrollo gonádico, periodo de interpuesta, tamaño de puesta y proporción de la gónada desovada distinto a las especies con desove externo. Este estudio describe histológicamente la embriogénesis y desarrollo larvario temprano de un eufáusido con estrategia de reproducción en saco ovífero, *Nyctiphanes simplex* Hansen 1911, para investigar la asociación y sincronización del desarrollo de éstos en el saco ovífero con los ciclos gonádico y de mudas. Los enjambres de eufáusidos se recolectaron en el Golfo de California durante julio de 2007 y marzo de 2010. 115 hembras ovíferas en diferentes fases de desarrollo gonádico y de mudas así como en distintos estadios de desarrollo embrionario se conservaron, procesaron y tiñeron utilizando diferentes técnicas histológicas. Se describió la embriogénesis de los estadios de una célula (zigoto), múltiples células, blástula, estadio de desarrollo temprano y tardío de apéndices, nauplio, pseudometanauplio, metanauplio y caliptopis. La eclosión ocurre en el estadio nauplio (N) desarrollándose en pseudometanauplio (PMN) y la liberación del saco ovífero ocurre en el estadio metanauplio (MN). Los embriones de *N. simplex* tuvieron una segmentación total (holoblastica) con similitudes en patrón de embriogénesis y linaje celular al eufáusido de desove externo *Meganyctiphanes norvegica* M. Sars 1957 y los decápodos Dendrobranchiata en el tamaño relativo de las células en división, patrón de posición y división de blastómeros así como la división tardía de dos grandes células del mesodermo. Las hembras ovíferas con embriones en las primeras etapas de división celular tienen gónadas en el estadio de multiplicación, a partir del estadio de nauplio algunas hembras presentan gónada en previtelogénesis y únicamente las hembras con metanauplios pueden ocasionalmente tener gónadas en vitelogénesis. Las hembras desarrollan la gónada madura exclusivamente después de completar la liberación de los embriones del saco ovífero y después de mudar (ecdisis). Las

hembras con saco ovífero invariablemente se encontraron en estadio de intermuda que sugiere una precisa sincronización entre el proceso de mudas, desarrollo gonádico y la liberación de los embriones. El hepatopancreas se desarrolla desde la caliptopis 1. La proporción de lípidos en los embriones disminuye a lo largo su desarrollo hasta el estadio caliptopis 1 cuando ocurre la primera alimentación exógena. Esto repercute en su habilidad para sobrevivir dependiendo de si los embriones están en condiciones alimenticias favorables o desfavorables. Se estima que el Punto-de-no-retorno (PNR) de las larvas caliptopis 1 es posiblemente entre 1-4 días después de la liberación de los embriones del saco ovífero.

## ABSTRACT

The euphausiid embryology has been studied only in broadcast spawning krill species from temperate and polar zoogeographic regions. Apparently they have highly synchronized gonad and molting cycles. In the past had been assumed that sac-spawning species have distinct gonad development, interbrood period, brood size, and proportion of the gonad spawned in comparison with broadcast spawning krill species. This study describes histologically the embryogenesis of the sac-spawning euphausiid, *Nyctiphanes simplex* Hansen 1911, and explores its temporal association with the gonad and molt development cycles. Euphausiids swarms were collected in the Gulf of California during July 2007 and March 2010. 115 ovigerous females in different stages of molt and gonadal development stages, and with distinct embryo development stage in their ovigerous sac were preserved, processed and stained using several histological techniques. We describe embryogenesis of one cell (zygote), multiple cells, morula, blastula, and early limb bud, late limb bud, twirling nauplius, pseudometanauplius, metanauplius and calyptopis 1 (the first free-swimming larval stage). Larvae hatch as nauplius (N), develop as pseudometanauplius (PMN) and the larvae are released from the ovigerous sac as metanauplius (MN). *N. simplex* embryos had total cleavage (holoblastic) with similar embryogenic pattern and cell lineage to the broadcast spawning krill *Meganyctiphanes norvegica* M. Sars 1857 and Dendrobranchiata decapods in the relative cell sizes, position and division pattern of the blastomeres, the two interlocking cell bands, and the delay in the division of the two large mesendoderm cells. Ovigerous females with embryos in cell division stages have gonad in multiplication stage, during nauplius stage several females had their gonads in previtellogenesis, and only females with MN occasionally have gonads in vitellogenesis. The gonad maturity occurs only after completing the release of the embryos from the ovigerous sac. Females with ovigerous sac were invariably in intermolt stage suggesting a precise synchronization among processes of molting, gonad development and the release of the embryos to produce consecutive broods. The hepatopancreas develops in the calyptopis 1. Embryo lipid proportion decrease throughout the embryonic development until the

calytopis 1 (first feeding stage); which influence the ability to survive under favorable or unfavorable trophic conditions. It is estimated that the Point-of-no-return (PNR) of the calytopis 1 larva could occur between 1-4 days after embryo leave the ovigerous sac.

## INTRODUCCIÓN

Los eufáusidos, también conocidos como krill, han despertado un gran interés en la comunidad científica debido a su posición y función en la trama trófica pelágica y demersal de los ecosistemas marinos y por que en ocasiones ellos son un componente significativo de la biomasa del zooplancton y micronecton que facilita la transferencia de energía de productores primarios, nieve marina y microzooplancton a niveles tróficos superiores (calamares, peces zooplanctófagos, aves, pinnípedos y ballenas barbadas) (Mauchline & Fisher, 1969; Bliss, 1985; Hempel, 1985; Schram, 1986; Gendron, 1992). Los eufáusidos son útiles indicadores zoogeográficos (Brinton, 1962; Bliss, 1985) y son organismos con potencial pesquero en ecosistemas polares, templados y subtropicales (Gómez-Gutiérrez, 1992; Pillar *et al.*, 1992; Nicol & Endo, 1999; Nicol, 2003; Arroyo-Ramírez *et al.*, 2005).

Actualmente existen al menos seis especies de eufáusidos comercialmente explotadas en la Antártida (*Euphausia superba* Dana 1850, *Euphausia crystallorophias* Holt & Tattersall 1906), Japón, las costas de Canadá, Estados Unidos de Norte América (*Euphausia pacifica* Hansen 1911, *Thysanoessa spinifera* Holmes 1900) y Atlántico del Norte (*Meganyctiphanes norvegica* M. Sars 1857, *Thysanoessa raschi* M. Sars 1864) con capturas mundiales de hasta 200,000 toneladas anuales (Nicol & Endo, 1999). La mayor parte de los estudios sobre biología y ecología de los eufáusidos han sido realizadas en estas seis especies, posiblemente promovido por su interés comercial. Todas las especies de eufáusidos son marinas, de las cuales 60 especies liberan sus embriones directamente en la columna de agua (desovadoras externas) y 26 especies liberan sus embriones en

sacos ovígeros adheridos al último par de los apéndices torácicos (Gómez-Gutiérrez, 2002, 2003; Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Las hembras ovígeras deben alternar varios procesos metabólicos para sobrevivir, crecer y reproducirse, de los cuales, el proceso de reproducción (ciclo gonadal), cuidado parental de los embriones en el saco ovígero y el proceso de mudas requieren una proporción sustancial de la energía adquirida por la hembra mediante la alimentación. Este estudio se enfocó al estudio histológico de estos tres procesos que ocurren simultáneamente en las hembras ovígeras del eufáusido *Nyctiphanes simplex* Hansen 1911: el desarrollo embrionario y larvario en el saco ovígero, el desarrollo gonádico y ciclo de mudas de la hembra. Debido a que estos tres procesos son altamente demandantes de energía para la hembra y su interacción temporal aún no ha sido estudiada en eufáusidos de manera simultánea, en esta tesis se plantea la hipótesis de que las hembras deben realizar de manera sincronizada estos procesos para incrementar su éxito reproductivo, cuidado parental y sus tasas metabólicas para maximizar los procesos de crecimiento somático y de reproducción.

## ANTECEDENTES

La mayor parte del conocimiento sobre la biología y ecología de los eufáusidos ha sido obtenida de especies de regiones templadas y polares con estrategia de desove externo, siendo considerablemente menos estudiadas las especies subtropicales y tropicales, particularmente las especies con estrategia reproductiva de sacos ovígeros (Everson, 2000; Brodeur & Yamamura, 2005).

Históricamente se ha supuesto que las especies con estrategias de desove externo y en saco ovígero tienen un patrón de desarrollo gonádico distinto en términos de duración del periodo de interpuesta (PIP), edad de primera madurez y de desove, tamaño de puesta, proporción de la gónada desovada por puesta, así como la fecundidad en términos de tasas de producción de huevos ( $\text{mg m}^{-3} \text{d}^{-1}$ ) (Brinton *et al.*, 2000; Ross & Quetin, 2000; Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010b). Para obtener una adecuada conceptualización y comprensión de cada una de las dos estrategias reproductivas de los eufáusidos es fundamental estudiar y comprender la biología reproductiva, metabolismo, los patrones de distribución, abundancia y tasa de reclutamiento larval que permitan conocer su biología reproductiva. Sin embargo, actualmente existe un considerable desbalance en conocimiento de la biología reproductiva de las especies con desove en saco ovígero en comparación a las especies de desove externo.

En el Golfo de California, dos de las tres especies de eufáusidos más abundantes y que contribuyen con mayor biomasa son *N. simplex* (>90%), *Nematoscelis difficilis* Hansen 1911 que tienen reproducción en saco ovígero,

seguido por *Euphausia eximia* Hansen 1911 (Brinton & Townsend 1980; Brinton *et al.*, 1986; Lavaniegos-Espejo *et al.*, 1989; Lavaniegos-Espejo, 1996; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010 a, b).

G. O. Sars (1898) realizó, mediante observaciones de microscopio, el primer estudio de desarrollo embrionario de los eufáusidos con la especie de desove externo *Meganyctiphanes norvegica* distribuida en el mar del Norte, definiendo y describiendo sus principales estadios de desarrollo embrionario y larvario temprano. G.O. Sars describió la morfología de los embriones desde una célula hasta estadio larvario de caliptopis y posteriormente Taube (1909, 1915) describió con mayor detalle el desarrollo de *M. norvegica* hasta estadio furcilia. En la década de 1960s se pensaba que los eufáusidos desovaban únicamente unas pocas veces durante su vida (Mauchline & Fisher, 1969). En la década de 1980's se demostró que el periodo del desove a la eclosión del krill Antártico *E. superba* era de aproximadamente 6 días y que de la eclosión a la larva de primer alimentación exógena (caliptopis 1) transcurrían aproximadamente 23 días (George, 1984). Stuart (1992) y Feinberg *et al.*, (2007) demostraron que los eufáusidos de desove externo pueden desovar consecutivamente en periodos de 2-7 días en múltiples puestas por periodos de meses. La producción de huevos es algunas veces inhibidora del proceso de mudas (Stuart, 1992). En especies con saco ovígero el número de puestas, los procesos de desarrollo embrionario, ciclos gonádico y de muda de las hembras aun no han sido estudiado.

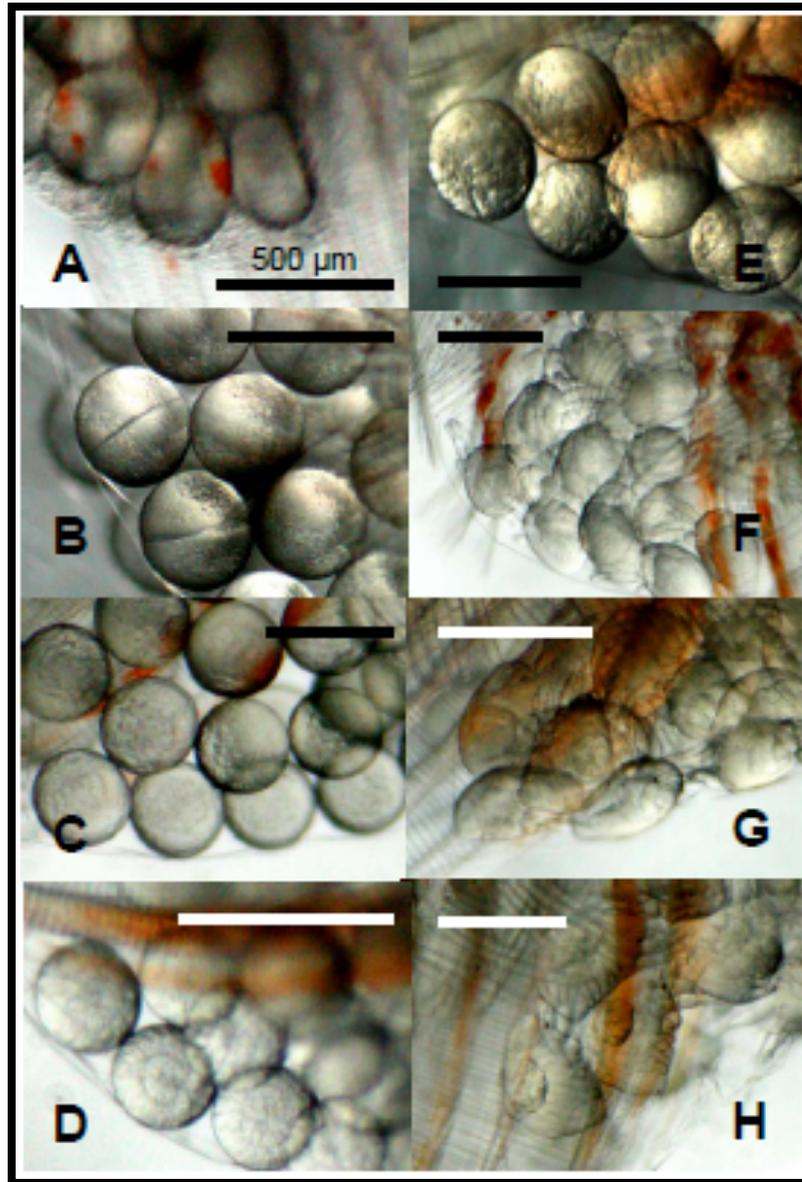
Excepto los estudios de Taube (1905, 1915) y Alwes & Scholtz (2004) en *M. norvegica*, aún no se ha estudiado la embriología interna del los eufáusidos, particularmente de las especies con estrategia reproductiva de saco ovígero.

Recientes estudios han enfatizado la necesidad de conocer mejor el desarrollo embrionario, el mecanismo de incubación y el cuidado parental de los eufáusidos debido a que estas son características biológicas relevantes en la interpretación de las relaciones taxonómicas y filogenéticas de los eufáusidos (Maas & Waloszek, 2001; Alves & Scholtz, 2004; Gómez-Gutiérrez, 2006).

Gómez-Gutiérrez (2002, 2003, 2006) resumió la clasificación de los estadios de desarrollo embrionarios de especies de krill con desove externo (Tabla 1). Gómez-Gutiérrez & Robinson (2005) fotografiaron, describieron y caracterizaron externamente los embriones del eufáusido con estrategia reproductiva de saco ovígero *N. simplex* definiendo los tiempos de desarrollo de cada estadio embrionario y larvario dentro del saco ovígero (Fig. 1). Con esto pudieron darse cuenta que aunque la morfología externa de los embriones de eufáusidos es similar entre especies con diferente estrategia reproductiva, estos tienen diferencias en el tamaño del espacio perivitelino, tiempos de desarrollo y el estadio en el que ocurre la eclosión (Gómez-Gutiérrez, 2002, 2003, 2006; Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Los embriones de *N. simplex* eclosionan en estadio nauplio rompiendo el corion por crecimiento somático (mecanismo de eclosión por expansión) y permaneciendo en el saco ovígero durante los estadios pseudometanauplio y metanauplio (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005).

**Tabla 1.** Estadios de desarrollo embrionario de los eufáusidos con estrategia reproductiva de desove externo y con saco ovífero (tomado de Gómez-Gutiérrez, 2002, modificado de Ponomareva, 1963; George & Strömberg, 1985; Quetin & Ross, 1984, 1989).

Estadio embrionario	Abreviatura	Descripción del estadio embrionario
Una célula	1C	Embrión recién desovado, con espacio perivitelino y sin señal de división celular.
Múltiples células	MC	Inicio de división celular
Blástula	Bla	Formación de dos capas de células
Gástrula	G	Formación de tres capas de células alrededor de la cavidad central (arquenterón)
Desarrollo temprano de apéndices	Etea	El embrión es transformado en un primordio nauplio, los apéndices naupliares (primera y segunda antena y mandíbula) siguen conectados al cuerpo por una membrana y los apéndices primordiales son visibles en vista lateral como protuberancias
Desarrollo tardío de apéndices	Etaa	Los extremos distales de los apéndices (primera y segunda antena y mandíbula) están libres, con forma de estructura tubulares
Nauplio	N	El nauplio ha completado su desarrollo, sin membrana rodeándolo, los apéndices libremente suspendidos del cuerpo le permiten moverse, y el corazón tiene pulsaciones



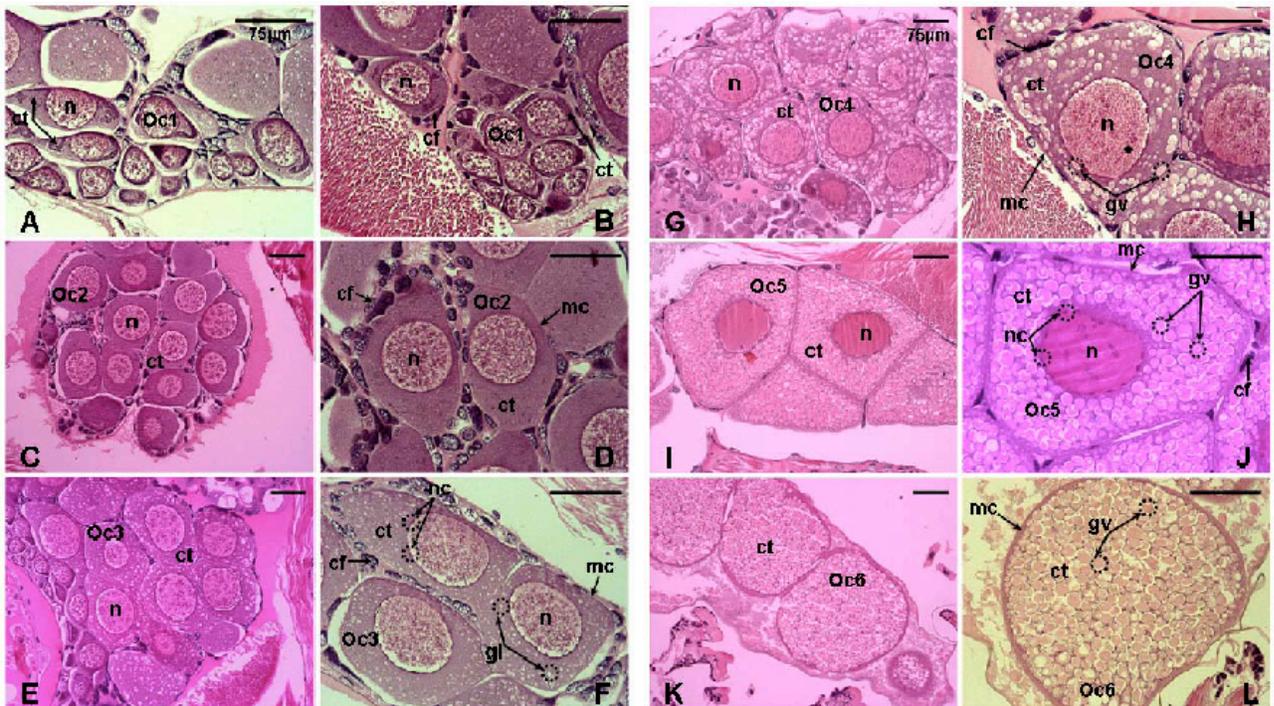
**Figura 1.** Fotografías del desarrollo embrionario y larvario temprano (pseudometanauplio y metanauplio) en el saco ovífero de *N. simplex*. (A) embriones ovoides recién eclosionados. (B) embriones esféricos de una célula y múltiples células, (C) blástula. (D) gástrula. (E) nauplio eclosionando. (F) Pseudometanauplio (G) Metanauplio con ojo naupliar negro. Escala de la barra = 500 µm (tomado de Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005).

La embriología de los crustáceos ha tenido un sorprendente avance de detalle a nivel de mapa celular y el destino de cada linaje celular debido a la implementación de técnicas de tinción fluorescente e histología (Sholtz & Dohle, 1996; Hertzler, 2002, Biffs *et al.*, 2009). Utilizando la tinción fluorescente se describió detalladamente sus estadios de segmentación y gastrulación mediante el mapa celular durante la embriogénesis temprana de *M. norvegica* (Alwes & Scholtz, 2004). Alternativamente se puede comprender el proceso de embriogénesis de los eufáusidos mediante el uso de técnicas histológicas tradicionales y técnicas histoquímicas para estudiar la morfología interna, organogénesis y como los lípidos son ubicados y utilizados por los embriones durante el proceso de embriogénesis.

Aunque la morfología externa y el tamaño de los estadios nauplio, pseudometanauplios y metanauplios de *N. simplex* fueron descritos por Boden (1951) y su morfología externa fotografiada por Gómez-Gutiérrez & Robinson (2005) (Fig. 1) el estudio de su morfología interna y utilización de lípidos durante la embriogénesis de especies de eufáusidos con desove de saco ovífero no tiene precedentes. Los embriones metanauplios de los eufáusidos obtienen energía a partir de sus reservas vitelinas embrionarias, sin embargo, cuando éstos se transforman en el primer estadio larvario (caliopsis 1) éstas inician su alimentación exógena (Ross & Quetin 1989; Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Por esta razón, la utilización de los lípidos estructurales y de reserva durante la embriogénesis es un proceso relevante para estimar el tiempo del Punto-de-No-Retorno (PNR), definido como el tiempo que una larva caliopsis 1 puede sobrevivir sin encontrar alimento, es decir es el umbral superior delimitado como el tiempo en que la caliopsis hambrienta muere aun cuando se le suministre abundante alimento (Ross & Quetin, 1989). Este

PNR y su posible existencia en la naturaleza imponen una limitante al reclutamiento larval de los eufáusidos con sus posibles consecuencias en su posterior abundancia, biomasa y producción secundaria poblacional. *E. superba* metaboliza aproximadamente 37% de los lípidos y 36% de las proteínas hasta el momento de la eclosión dejando únicamente estas reservas para la fase caliptopis 1 (estadio de primera alimentación exógena).

Zavala-Hernández (2007) describió y comparó el desarrollo gametogénico de las hembras y machos de las tres especies de eufáusidos más abundantes del Golfo de California (*N. simplex* y *N. difficilis*, con estrategias de desove en saco ovífero y *E. eximia*, con estrategia de desove externo) no detectando diferencias interespecíficas en su morfometría de los ovocitos, desarrollo gonádico. Él utilizó técnicas histológicas para describir la morfología de los ovocitos, realizar mediciones morfológicas y estimar frecuencias relativas de los estadios y sub-estadios de desarrollo ovárico (Fig. 2). Zavala-Hernández (2007) y Gómez-Gutiérrez *et al.* (2010 b) propusieron un modelo conceptual para estimar el tiempo de desarrollo de un estadio gonádico a otro en referencia a la mediana de la duración de cada estadio de desarrollo embrionario de *N. simplex* en su saco ovífero. Esto fue realizado para obtener estimaciones de fecundidad más precisas que serán incluidas en modelos de reclutamiento larval y producción secundaria (Cuzin-Roudy, 2000; Gómez-Gutiérrez & Robinson 2005; Martínez-Gómez, 2009).



**Figura 2.** Cortes histológicos longitudinales de gónadas femeninas del eufáusido *Nyctiphanes simplex*. Escala de la barra 75 µm. Tinción H-E. Micrografía de ovario en Estadio I (previtelogénesis). (A y B) Ovocitos en sub-estadio de nucleolo cromatina temprano (Oc1) (200×), (C y D) ovocitos en sub-estadio de nucleolo cromatina tardío (Oc2) (100× y 200×) y (E y F) ovocitos en sub-estadio de glóbulo lipídico (Oc3) (100× y 200×) cf, células foliculares; ct, citoplasma; gl, glóbulo lipídico; mc, membrana citoplásmica; n, núcleo; nc, nucleolo. (G y H) Ovocitos en subestadio de glóbulo de previtelo (Oc4) (100× y 200×). (I y J) Ovario en estadio III (madurez) con ovocitos en sub-estadio de glóbulo de vitelo (Oc5) (100× y 200×). Ovario en estadio IV (desove). (K y L) Ovocitos en sub-estadio de glóbulo de rompimiento de vesícula germinal (Oc6) (100× y 200×) (tomado de Zavala-Hernández, 2007; Gómez-Gutiérrez et al., 2010 b).

El estudio de los procesos de desarrollo ovárico y desarrollo embrionario de *N. simplex* permitió visualizar diferencias en la biología de las especies con saco ovígero y de desove externo (Zavala-Hernández, 2007; Gómez-Gutiérrez et al., 2010 a,b). En las especies con saco ovígero es posible seguir simultáneamente el desarrollo de los embriones en relación con el desarrollo gonádico y el ciclo de mudas de la hembra para comprender como estos tres procesos, altamente demandantes de energía, interactúan entre sí.

La asociación temporal entre el desarrollo gonádico y el ciclo de muda de las hembras ovígeras aún es pobremente comprendido en especies con desove en saco ovígero, pero en especies con desove externo supuestamente estos dos procesos son altamente sincronizados (Tarling & Cuzin-Roudy, 2003) aunque existe evidencia de una elevada variabilidad individual entre hembras (Feinberg *et al.*, 2007). Los ciclos de muda de los crustáceos son controlados por las hormonas neurosecretoras del órgano X, localizado en el pedúnculo ocular, y el órgano Y localizado cerca de la región bucal (Nakatsuji & Sonobe, 2004). Las hormonas ecdysteroides son secretadas por el órgano Y para estimular la apólsis y la ecdisis. La apólsis es el proceso de separación de la vieja cutícula (exoesqueleto) de la epidermis produciendo un espacio entre ambas el cual es reemplazado posteriormente por una nueva cutícula. La ecdisis es el preciso momento en que la cutícula se retira del crustáceo (muda). Los procesos de apólsis y ecdisis son seguidos de un proceso de reconstrucción cuticular e incremento de biomasa del cuerpo del crustáceo (Musgrove, 2000; Nakatsuji & Sonobe, 2004). Sin embargo, los eufáusidos tienen la capacidad de mudar con un incremento en crecimiento somático (tasa instantánea de crecimiento positiva), no crecer (tasa instantánea de crecimiento igual a cero), o disminuir su talla corporal y biomasa (tasa instantánea de crecimiento negativa) (Hosie & Ritz, 1989; Nicol, 2000; Martínez-Gómez, 2009).

La cutícula de los crustáceos está compuesta por dos capas principales: (1) la epicutícula y (2) la procutícula. La procutícula está a su vez dividida en tres subcapas: (2a) exocutícula, (2b) endocutícula y (2c) capa membranosa. La epicutícula y exocutícula son sintetizadas antes de la ecdisis y forman la capa pre-

ecdysis. La endocutícula y la capa membranosa son sintetizadas después de la ecdysis y forman la capa post-ecdysis (Skinner, 1985).

Se han realizado estudios en crustáceos decápodos para determinar el momento de la ecdysis con respecto a las características morfológicas de la cutícula (Promwikorn *et al.*, 2004) y los cambios en la caracterización histológica de las fibras de colágeno, carbohidratos, lípidos y sales de Calcio de la cutícula asociados al proceso de muda (Promwikorn *et al.*, 2005). Dependiendo de los componentes de la cutícula y el grosor relativo del exoesqueleto de las hembras ovígeras de *N. simplex* se puede definir en que estadio de muda se encuentra cada animal asociando su temporalidad de estadio de muda con los procesos del desarrollo embrionario y desarrollo gonádico. En el presente estudio se propone la hipótesis de que existe una sincronización entre los procesos de desarrollo gonádico y muda de la hembra ovígera, desove, desarrollo embrionario y larvario dentro del saco ovígero, que evita que *N. simplex* culmine estos procesos al mismo tiempo con una sincronización fisiológica que incremente su éxito reproductivo y cuidado parental. Este estudio pretende dar una descripción secuencial de la división celular y organogénesis de *N. simplex* durante el desarrollo embrionario y larvario dentro del saco ovígero y fuera de este así para establecer la asociación temporal de estos procesos con el ciclo gonádico y de mudas de la hembra ovígera utilizando técnicas histológicas e histoquímicas.

## JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la filogenia y evolución de los crustáceos malacostrácos aparecen frecuentemente los huevos nauplio (HN), excepto en los eufáusidos y los decápodos. El HN es un estadio embrionario con abundante vitelo, la primera y segunda antena son unirrámeas y la segunda antena es birrámea. El nauplio de los eufáusidos puede presentarse en fase embrionaria (antes de eclosionar) o de vida libre (después de la eclosión) en distintas especies de krill (Gómez-Gutiérrez, 2006). Ambos tipos de nauplios de los eufausidos tienen relativamente poco vitelo y la segunda antena y la mandíbula son birrámeas. Por esta razón, se ha propuesto que los eufáusidos no tienen huevo nauplio. La embriogénesis y la ontogenia larvaria de los eufáusidos con estrategia reproductiva en saco ovígero aún no han sido estudiada y posiblemente pueden ser más parecidas a las de los decápodos o mysidáceos (en relación a otro grupo de los crustáceos malacostráceos). El estudio detallado de sus mapa celular, organogénesis puede proveer información relevante para comprender las relaciones filogenéticas de los eufausidos con otros órdenes de los crustáceos malacostráceos y para comprender cómo estos organismos han evolucionado para adaptarse al ecosistema pelágico marino desde etapas tempranas.

Los eufáusidos tienen una función trófica significativa en la cadena alimenticia y debido a su abundancia también son una fuente importante de proteína, enzimas antioxidantes para la industria farmacéutica, acuarística (como alimento de peces de ornato) y acuicultura. En el Golfo de California *N. simplex* es la especie más

frecuente y abundante que afortunadamente aún no ha sido explotada comercialmente. Antes de que esto suceda, es importante, conocer aspectos de su biología como la embriología, ontogenia y reproducción la cual proporcionará bases conceptuales para desarrollar en el futuro un plan de manejo pesquero sin afectar significativamente sus poblaciones ó la de sus depredadores.

## **OBJETIVOS**

1) Describir la embriogénesis de la progenie en el saco ovífero y larvas tempranas de vida libre con alimentación exógena (caliopsis 1-3) del eufáusido subtropical *Nyctiphanes simplex* Hansen, 1911.

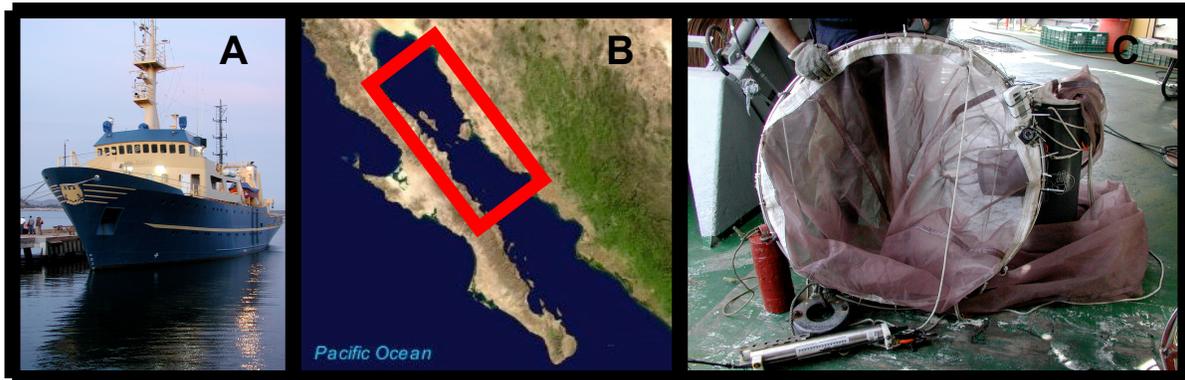
2) Realizar un modelo conceptual de la asociación temporal de los ciclos de desarrollo gonádico y de muda de las hembras del eufáusido *Nyctiphanes simplex* con el desarrollo embrionario y larvario de su progenie.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Los eufáusidos fueron recolectados durante dos cruceros oceanográficos realizados en la región norte y centro del Golfo de California durante julio-agosto de 2007 y en marzo de 2010 a bordo del buque oceanográfico El Puma (Universidad Nacional Autónoma de México).

### **Trabajo de campo**

Los enjambres de los eufáusidos fueron detectados hidro-acústicamente con una ecosonda Simrad EY-500 con haz de sonido dividido de 120 kHz de frecuencia (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2006). Los eufáusidos fueron capturados en la profundidad donde la ecosonda mostró densas capas de dispersión de sonido con una red de deriva de 1-m de diámetro, 5-m de largo y una luz de malla negra de 300  $\mu\text{m}$ , provista con un copo recolector cerrado (0.22 m diámetro y 0.70 m alto) (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005, 2006). Esta red estuvo equipada con una lámpara sumergible (Ikelite Pro-Video–Lite II system de 50 Watts) (Fig. 3). Los arrastres se realizaron durante aproximadamente 10 minutos preferentemente durante la noche y con el buque a la deriva para evitar dañar a los eufáusidos capturados.



**Figura 3.** (A) B/O El Puma, (B) Área de estudio. (C) Red de deriva mostrando el copo modificado para evitar daño de eufáusidos, cámara y lámpara submarina (Fotos cortesía de Gómez-Gutiérrez).

Los organismos del zooplancton recién recolectados fueron puestos en una hielera con agua marina del mismo copo recolector. Los eufáusidos fueron separados con cucharas de plástico para observarlos en vivo con un estereoscopio Carl Zeiss SV11, equipado con una cámara Olympus Camedia 3040 de 3.3 megapíxeles de resolución o una cámara Olympus Tough de 12 megapíxeles de resolución. Los eufáusidos capturados fueron observados *in vivo* para identificar su sexo y especie siguiendo los criterios de identificación de Baker *et al.* (1990) y Brinton *et al.* (2000). En cada hembra ovígera de *N. simplex* se identificó el 1) estadio de desarrollo gonádico basado en la morfología de los ovocitos y su proporción relativa de la gónada en el cefalotórax (Ross *et al.*, 1982); 2) estadio de muda, siguiendo los criterios del método Drach basado en cambios macrosópicos del integumento y desarrollo de las setas de los eufáusidos (Buchholz, 1982) y 3) estadio de desarrollo de los embriones dentro del saco ovígero (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005).



**Figura 4.** Fotografía de macho con espermatóforo extruído (color rojo) y hembra ovígera de eufáusido *Nyctiphanes simplex*. (Foto cortesía de Gómez-Gutiérrez).

Se recolectaron 115 hembras de *N. simplex* con sacos ovígeros en diferentes estadios de desarrollo embrionario que se fijaron con 1) solución Karnovsky para la inclusión en resina, ó 2) solución Davidson para la inclusión en parafina. Las hembras preservadas en solución Karnovsky se mantuvieron en oscuridad y refrigeración (4°C) durante 48 h , posteriormente éstas se transfirieron a etanol al 30%. Las muestras fijadas en solución Davidson fueron mantenidas en refrigeración hasta llegar al laboratorio.

### **Análisis histológicos**

Los eufáusidos fijados se deshidrataron en una serie progresiva de concentraciones crecientes de alcohol etílico (70% a 100%) en el laboratorio de histología e histoquímica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, B.C.S., México).

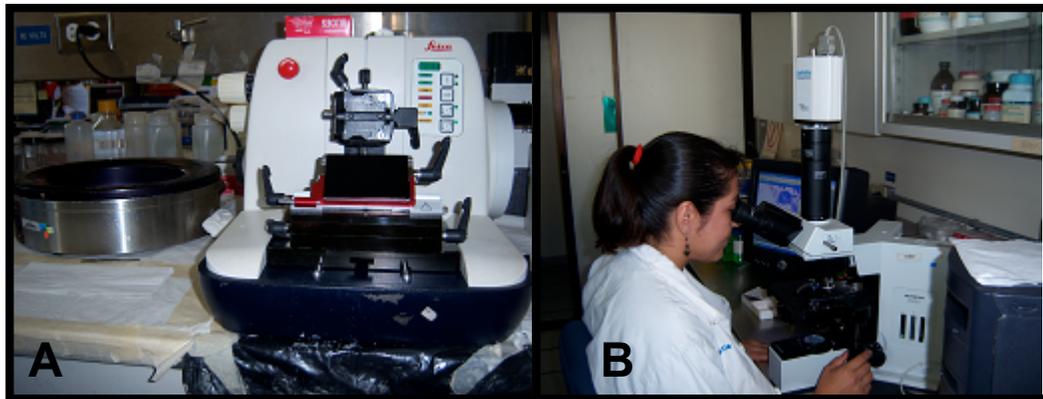
**Cortes en parafina.** Posterior a la deshidratación, las muestras fijadas en Davidson se aclararon en xilol y se incluyeron en parafina (Paraplast X-Tra, McCormick Scientific, San Diego, CA, USA). Los cortes se hicieron de 4  $\mu\text{m}$  de grosor con ayuda de un microtomo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems) y se colocaron en portaobjetos. Después de desparafinar las muestras, éstas se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson (Anexo 1) para identificar fibras de colágeno o Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar carbohidratos en la cutícula de las hembras (Anexo 2). Las preparaciones histológicas se montaron con cubreobjetos y resina sintética.

**Cortes en resina.** Las muestras fijadas en solución Karnovsky (Karnovsky, 1965) se embebieron en resina tipo metacrilato (JB-4Plus, Polysciences, Warrington, PA, USA) (Anexo 3). Las muestras embebidas en resina se cortaron en secciones de 1  $\mu\text{m}$  y 2  $\mu\text{m}$  con ayuda de un microtomo rotatorio con navajas de carburo de tungsteno (Leica TC65). Los cortes se tiñeron con ácido periódico de Schiff (PAS) (Anexo 2) para la identificación de carbohidratos en la cutícula de la hembra (Sheehan & Hrapchak, 1980). Otras muestras se tiñieron con la técnica de Sudán Negro para la identificación de lípidos (Rodríguez-Moscoso & Arnaiz, 1998) (Anexo 4), mientras que otras muestras se tiñieron con una técnica policrómica para la descripción general de los estadios de desarrollo de los embriones y las larvas (Tolivia *et al.*, 1994). Las muestras histológicas teñidas se observaron en un microscopio Olympus BX50 (Olympus optical, Japan).

## Histología cuantitativa y cualitativa

Las imágenes de los tejidos fueron digitalizadas y analizadas con un Sistema de Análisis Digital de Imágenes (Image Pro-Plus v.4.1) (Fig. 5). Para el análisis cualitativo y cuantitativo de la morfología de los gametos ubicados en el hemocele se llevó a cabo la misma técnica realizada por Gómez-Gutiérrez *et al.* (2010b). Los tipos de ovocitos presentes en cada estadio gonádico se identificaron con los criterios descritos por Yano (1988) y Cuzin-Roudy (1993), modificado para eufáusidos por Zavala-Hernández (2007) y Gómez-Gutiérrez *et al.* (2010 b).

Se realizó un análisis semi-cuantitativo de la proporción de lípidos y carbohidratos en cada estadio de desarrollo embrionario y larvario dentro del saco ovífero de *N. simplex* tiñiéndolos con Sudán Negro para lípidos y PAS para carbohidratos. En cada fotografía se seleccionó el perímetro del embrión o larva teñido con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics versión 4.5.19). Este programa calculó la proporción de píxeles del color respectivo a los lípidos (de azul a negro pasando por gris) y carbohidratos (magenta) con respecto al área total del embrión.

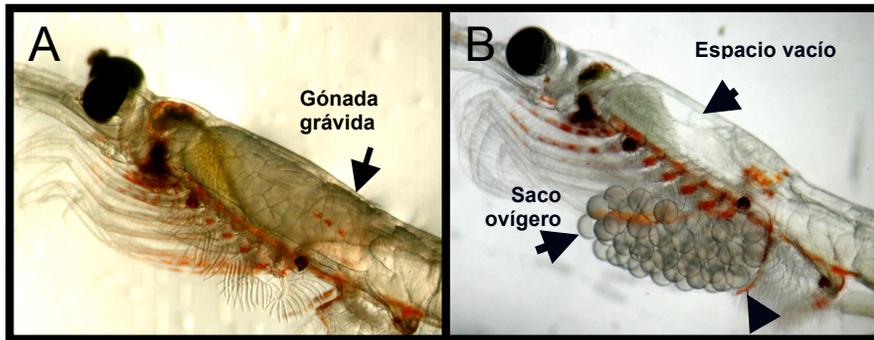


**Figura 5.** A) Fotografía del microtomo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems) y B) digitalización de imágenes de embriones y hembras de *N. simplex* con el Sistema de Análisis Digital de Imágenes (Image Pro-Plus v.4.1).

Para construir un modelo conceptual de la asociación temporal entre desarrollo gonádico y ciclo de mudas de las hembras y el desarrollo embrionario de *N. simplex*, los tiempos de desarrollo gonádico y de mudas se estimaron con las medianas de los tiempos de desarrollo embrionario de cada estadio a 16°C (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Se realizó una descripción de la división celular, la formación de la blástula, gástrula y seguimiento de las capas germinales de los embriones de *N. simplex* siguiendo la nomenclatura y descripción definida para el eufáusido *M. norvegica* (Alwes & Scholtz, 2004). Esta nomenclatura se basa en 4 letras mayúsculas A, B, C y D las cuales designan a los blástomeros en el estadio de 4 células (Fig. 8). Los blastómeros del estadio de 2 células se designó como AB a la célula más pequeña, que posteriormente producirá las células hijas A y B y se designó CD a la célula más grande, la cual se divide posteriormente en C y D. Las células hijas de estas cuatro células se designaron con los índices I y II, como A<sub>I</sub> y A<sub>II</sub> (Fig. 8). Además, se definió la diferenciación celular y formación de los tejidos y órganos (organogénesis) de los embriones en estadio temprano y tardío de desarrollo de apéndices, nauplio, las larvas en el saco ovífero (pseudometanauplio, metanauplio) y larvas de vida libre (caliopsis 1 a 3). La descripción del desarrollo gonádico de *N. simplex* se basó en la nomenclatura definida en Gómez-Gutiérrez *et al.* (2010 b) y los estadios de la muda de la hembra *in vivo* se basó en los criterios propuestos por Buchholtz (1982). La identificación de el estadio de muda se identificó histológicamente con los criterios de estadios de muda descritos para el camarón decápodo *Penaeus monodon* (Promwikorn *et al.*, 2004, 2005).

## RESULTADOS

**Desove:** Las hembras grávidas de *N. simplex* (gónada color rosa) desovan sus huevos por el oviducto hacia un par de sacos ovígeros membranosos transparentes y asimétricos sostenidos por el octavo par de apéndices torácicos (periópodos). Estos apéndices ayudan a mover los sacos ovígeros de arriba hacia abajo y visceversa posiblemente para oxigenar a los embriones. El saco ovígero puede tener forma de pera, elíptica ó irregular dependiendo del número de embriones y el estadio de desarrollo en que estos se encuentren.



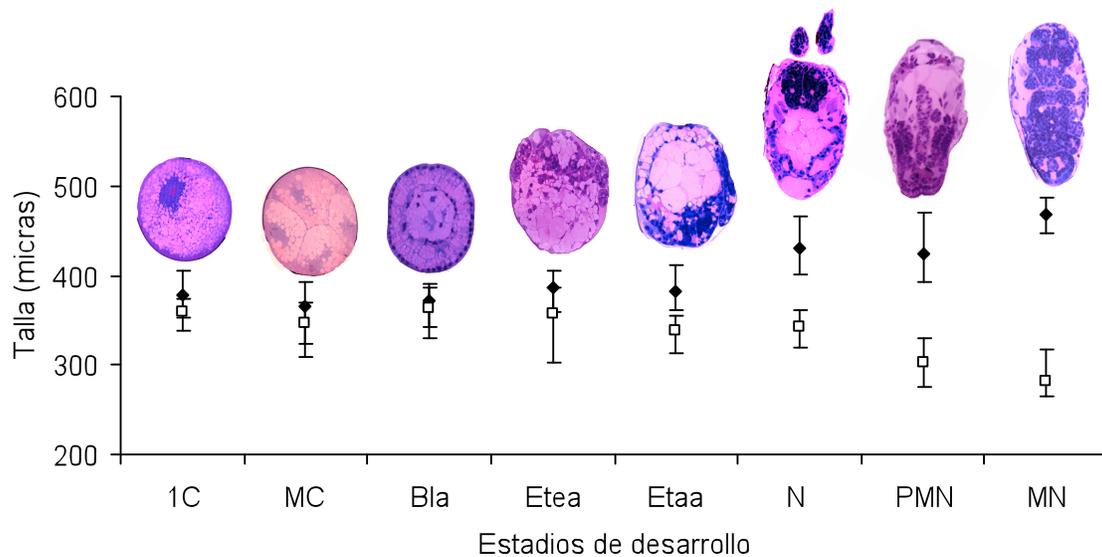
**Figura 6.** *N. simplex*. Hembra (A) grávida y (B) ovígera en los primeros estadios embrionarios. El espacio vacío en el cefalotórax es evidencia de que la hembra desova gran parte de su gónada en un cada evento de desove.

Los estadios de desarrollo embrionario y larvario observados dentro del saco ovígero fueron: una célula (1C), multicélulas (MC), blástula (BL), ETea (desarrollo temprano de apéndices), ETaa (desarrollo tardío de apéndices), nauplio (N), pseudometanauplio (PMN) y metanauplio (MN). No se pudieron encontrar hembras con embriones en el saco ovígero en estadio de gástrula, posiblemente por que este estadio sucede rápidamente y la posibilidad de detectarlo en las hembras recolectadas e incubadas es relativamente pequeña. Algunos metanauplios que

fueron liberados por las hembras al momento de observarlas en vivo, fueron separadas en botes de plástico, se alimentaron con una mezcla natural de microalgas y se incubaron en un cuerto frío del barco hasta que desarrollaran cada una de las etapas de larvas caliptopis (Caliptopis 1, 2 y 3).

### **Morfología y biometría de los embriones**

Los huevos no fertilizados de *N. simplex* son ovoides y se desintegran en pocas horas después de ser desovados en el saco ovífero. Los huevos fertilizados son esféricos, completamente llenos de vitelo y tienen un diámetro promedio de 370  $\mu\text{m}$  (Fig. 7). Los embriones de *N. simplex* tuvieron una segmentación total (holoblástica). Durante los primeros estadios embrionarios, desde la primera división celular hasta la blástula los embriones mantienen una forma esférica (circular en un corte bidimensional). El embrión en estadio gástrula también tiene una forma circular (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). A partir del estadio Etaa los embriones tienden a alargarse por el eje postero-anterior adquiriendo una forma cada vez más ovoide (elíptica en un corte bidimensional). A partir del estadio embrionario de nauplio se inicia la elongación morfológica de la larva, durante los estadios pseudometanauplio y metanauplio las larvas se vuelven notablemente más oscuras y robustas (Fig. 7).



**Figura 7.** Biometría de de los estadios de desarrollo embrionario y larvario en el saco ovífero de *Nyctiphanes simplex*. En orientación longitudinal (diamantes negros) y transversal (cuadrados blancos). 1C= una célula, MC = múltiples células, Bla = blástula, Etea = estadio de desarrollo temprano de apéndices, Etaa= estadio de desarrollo tardío de apéndices, N = nauplio, PMN = pseudometanauplio y MN = metanauplio.

### Desarrollo embrionario en el saco ovífero

La nomenclatura usada para el linaje celular es la definida para el eufáusido *Meganyctiphanes norvegica* (Alwes & Scholtz, 2004) y crustáceos decapados dendrobranchiata (Hertzler, 2005; Biffis *et al.*, 2009). Aproximadamente 2 h después del desove, el núcleo del huevo queda un poco fuera del centro y las cromatinas comienzan a separarse cada una asociada a un cuerpo polar. Esta división da lugar a dos células que ligeramente difieren en tamaño, la más chica se denomina “AB” y la mas grande “CD” (Fig. 8 B). En este momento es difícil distinguir los polos vegetal y animal. Los blastómeros aumentan en número, pero no en tamaño. El vitelo de cada uno de los blastómeros se concentra en gránulos distribuidos de manera uniforme (isolecitos), existe una masa central de citoplasma alrededor del núcleo y el

espacio perivitelino entre el embrión y el corion es virtualmente indetectable con el aumento del estereoscópio a 6.6× de magnificación.

Durante la siguiente división mitótica se forman cuatro blastómeros que difieren ligeramente en tamaño, los cuales se orientan en direcciones opuestas para formar un paquete de células en forma de cruz (células A, B, C y D). La célula de menor tamaño se denomina célula “A” y la más grande es la célula “D” (Fig. 8C). Las siguientes divisiones celulares ocurren en ángulo recto y forman células simétricas, se le llama división como espejo (células A<sub>I</sub>, A<sub>II</sub>, B<sub>I</sub>, B<sub>II</sub>, C<sub>I</sub>, C<sub>II</sub>, D<sub>I</sub> y D<sub>II</sub>).

En la formación de ocho células, los blastómeros son casi iguales en dimensión, excepto una que es ligeramente más grande en *N. simplex* que las demás que en otras especies de eufáusidos la cual se denomina célula D<sub>II</sub> (que posteriormente formará la parte dorsal y ventral del embrión) (Fig. 8E). Esta célula se expande hacia adentro de lo que formará la blástula y marca el polo vegetal. En teoría esto posteriormente va a formar el arquenteron de la gástrula, que después en el estadio nauplio dará lugar al ano. El polo animal formará la parte cefálica (anterior) del nauplio.

Mientras la célula D<sub>II</sub> permanece en anafase, las células de alrededor se siguen dividiendo hasta formar aproximadamente 30 blastómeros (Fig. 8D). Posteriormente, la división de la célula D<sub>II</sub> da lugar al eje dorso-ventral del cuerpo [D<sub>II</sub>dd (X<sub>d</sub>)] y [D<sub>II</sub>dv (X<sub>v</sub>) ]. Esto ocurre aproximadamente 21 h después del desove usando como referencia el tiempo de desarrollo embrionario de *N. simplex* (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). En esta etapa ocurre la formación de 32 células, las cuales definen formalmente la formación de la blástula (Fig. 8F). En esta figura se

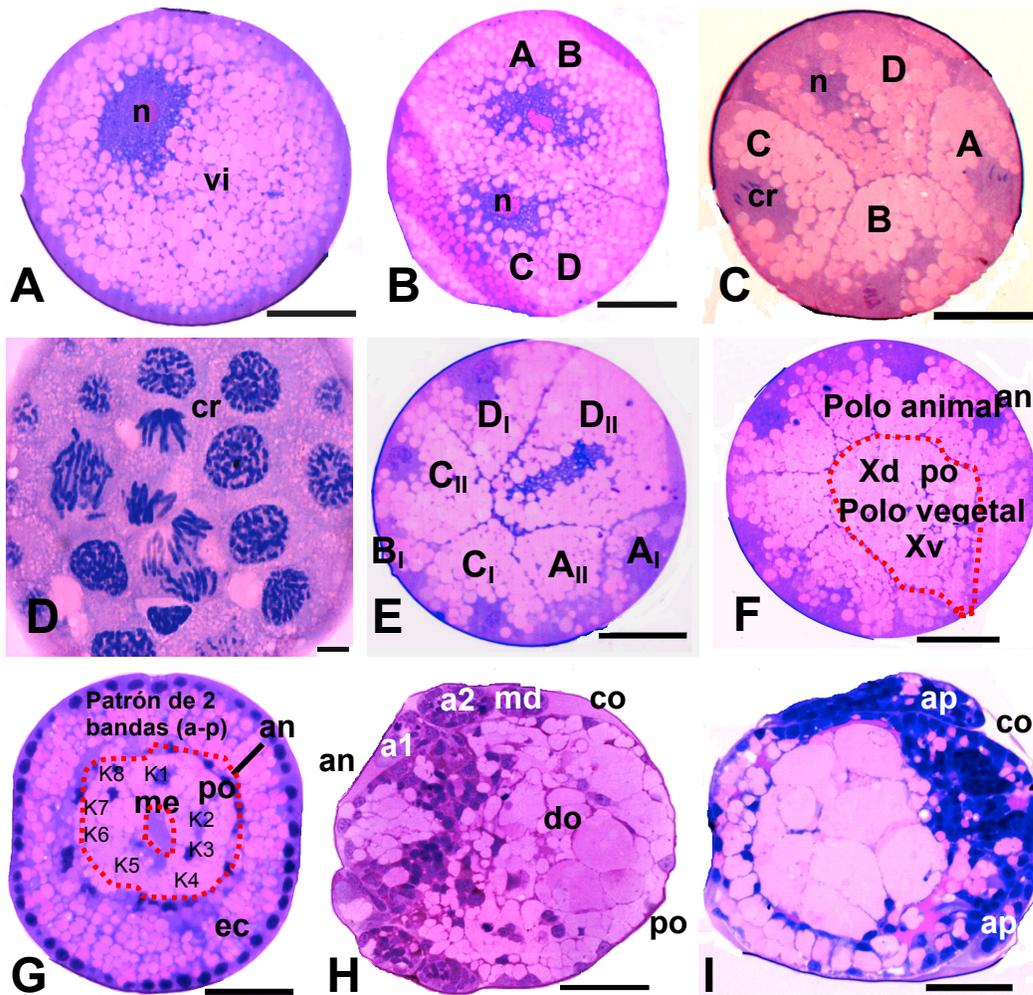
distingue la zona ventral ( $X_v$ ), la zona dorsal ( $X_d$ ), la zona anterior (an) y la zona posterior (po) del embrión.

Estas células  $X_d$  y  $X_v$  permanecen en interfase mientras que la división del resto de los blastómeros no se detiene formando aproximadamente 60 blastómeros que se mueven hacia las células mesendodérmicas para invaginarse llenando casi por completo el blastocele. Alrededor de las células  $X_d$  y  $X_v$  se forma un anillo de células llamadas Kranzzellen ( $K_1$ - $K_8$ ), que en los eufáusidos (corroborado aquí para *N. simplex*) son ocho (Fig. 8 G). Esto permite distinguir dos capas germinales: mesodermo (me) y ectodermo (ec). El anillo de ocho células Kranzzellen que rodean el blastoporo formará el arquenterón en la gástrula.

En esta etapa, aproximadamente 40 h después del desove (Gómez- Gutiérrez & Robinson, 2005), el polo animal ya contiene células ectodérmicas y posee una mayor división celular en comparación con el polo vegetal (Fig. 8 F y G). Posteriormente, el patrón de dos bandas de células en el polo animal desaparece (an-po), las células Kranzzellen tienen su última división dando lugar a 16 células en el anillo alrededor de las células  $X_d$  y  $X_v$ . En teoría esto sucede cuando se inicia la gastrulación. A pesar del esfuerzo de recolectar e incubar 115 hembras ovígeras ninguna tuvo embriones en estadio gástrula lo que indica que este estadio es posiblemente muy breve y/o difícil de detectar.

Posterior al estadio de gástrula se observa una disposición espacial diferente de las células y la aparición primordial de los tres primeros pares de apéndices que serán los tres apéndices del nauplio: primera antena (a1), segundantena (a2) y la mandíbula (md). Esta aparición de apéndices da el nombre a los dos estadios siguientes conocidos como estadios de desarrollo temprano (Etea) y tardío (Etaa) de

desarrollo de apéndices. El estadio de Etea, mostrado en un corte longitudinal frontal, tiene tres pares de apéndices caracterizados por ser un grupo de células encerradas en una membrana o cutícula de forma ovalada, estos se encuentran lateralmente cerca de la porción anterior del embrión (región cefálica) (Fig. 8H). En el estadio tardío de apéndices (Etaa) se observa al menos uno de los apéndices extendido a lo largo y pegado al cuerpo (Fig. 8 I). En ambos estadios (Etea y Etaa) se distingue el corion por la pequeña separación que se da entre el cuerpo del embrión y sus apéndices (espacio perivitelino) acompañado de una notable elongación del embrión (Fig. 8 I).



**Figura 8.** Desarrollo embrionario de *N. simplex* desde la primera división celular hasta antes de la eclosión del nauplio en estadio tardío de apéndices. **A)** Una célula. **B)** Dos células. **C)** Cuatro células. **D)** Mitosis celular en telofase. **E)** Blastulación, división celular alrededor de la zona D<sub>II</sub>. **F)** Blástula. **G)** Blástula completamente formada. **H)** Estadio de desarrollo temprano de apéndices (Etea), **I)** Estadio de desarrollo tardío de apéndices (Etaa). a1 = primera antena, a2 = segunda antena, an = zona anterior, ap = apéndice, co = corion, cr = cromatina, do = zona dorsal, ec = ectodermo, me = mesodermo, md = mandíbula, n = núcleo, po = zona posterior, ve = zona ventral, vi=vitelo. Barra de escala = 100 µm, excepto en la figura D que es de 10 µm. Las fotografías son de embriones incluidos en resina y teñidos con la técnica policrómica, excepto la figura H que fue teñida con la técnica de PAS.

### **Desarrollo larvario en el saco ovígero y formación de tejidos**

Cuando el embrión en estadio tardío de apéndices se desarrolla en un nauplio, éste eclosiona rompiendo el corion conforme incrementa su volumen corporal (mecanismo de eclosión por expansión). A partir de este momento, los nauplios dejan de ser embriones y se convierten en larvas que siguen su desarrollo morfológico en el saco ovígero pero manteniendo su alimentación endógena (consumo del vitelo).

**Nauplio** El cuerpo del nauplio adquiere una forma ovalada y los apéndices se ven extendidos y libres en distintas posiciones. En el cuerpo del nauplio las células comienzan a agruparse y diferenciarse para posteriormente formar distintos tejidos. En la figura 9A se muestra un nauplio con los tres pares de apéndices extendidos cerca de la región ventral anterior: primera antena (a1), segunda antena (a2) y mandíbula (md). Cerca del área dorsal se observa una fila de células de color azul, la cual se interpreta como un primordio del intestino (pi). En el área ventral se detectó un gran número de células nucleadas (aún no diferenciadas) que posteriormente darán lugar al resto de los apéndices cefálicos y el abdomen (Fig. 9 A y B).

En la parte central del cuerpo del nauplio se detectó un cúmulo de células grandes con una distribución alargada hacia la parte dorsal. Éstas posiblemente sean células lipídicas que pueden representar las reservas aún no utilizadas por el nauplio para la formación de órganos y tejidos (posiblemente precursoras del tejido adiposo de juveniles y adultos). Alrededor de este grupo de células se observó una sustancia acelular que posiblemente sea hemolinfa (hlf).

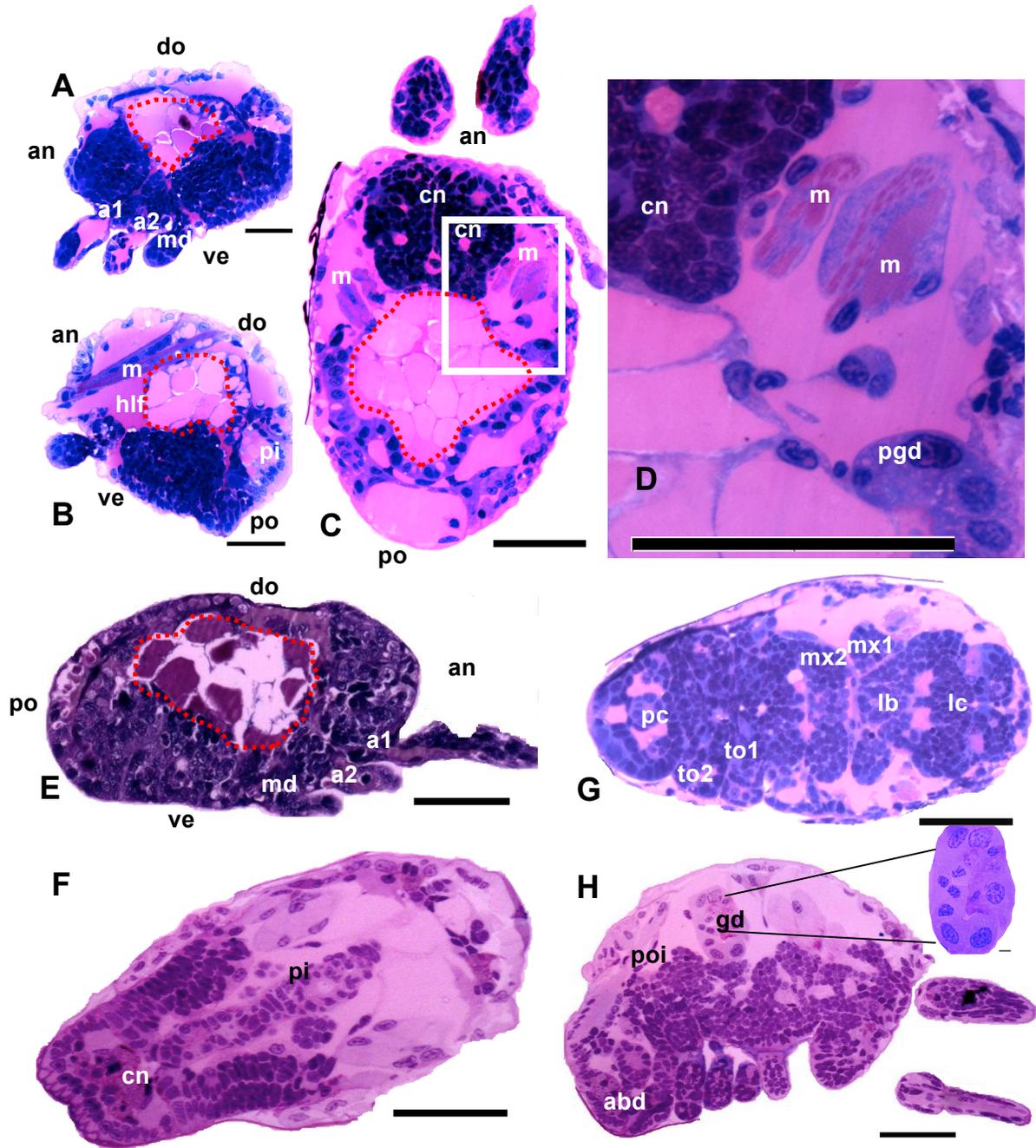
En un corte longitudinal frontal realizado cerca del área dorsal anterior del nauplio (área cefálica) se distinguió una densa acumulación de células (Fig. 9 C). También se distinguieron dos pares de paquetes de músculo estriado (m) probablemente asociados a algunos de los apéndices a1, a2, y/ó md, así como una acumulación de células que sugiere ser el primordio de la glándula digestiva (pgd) también conocido como hepatopancreas.

**Pseudometanauplio y metanauplio.** En el estadio de pseudometanauplio, que se desarrolla aproximadamente entre 90 y 105 h después del desove (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005), se incrementa sustancialmente su elongación longitudinal adquiriendo forma de pera (Fig. 9 F). El cúmulo de células ubicado en la parte ventral forma pequeños paquetes que formarán al resto de los apéndices cefálicos y la zona de posibles células lipídicas de reserva (delimitadas por la línea roja) (Fig. 9 E). Las células que darán lugar al intestino comienzan a separarse para formar el tubo digestivo que aun esta en etapa de primordio intestinal (pi) (Fig. 9 F). Los pseudometanauplios vivos desarrollan el ojo naupliar como un pequeño punto negro en la parte anterior de la región cefálica. Sin embargo, en este estudio no se pudo detectar histológicamente la región de células de este ojo naupliar posiblemente porque este es menos evidente cuando los organismos son preservados o debido a su pequeño tamaño que dificulta ubicarlo tridimensionalmente en los cortes histológicos.

La metamorfosis del estadio pseudometanauplio a metanauplio ocurre aproximadamente entre 92 y 140 h después del desove (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). En la parte ventral se distinguen células empaquetadas que darán lugar a la maxílula (mxl), maxila (mx), toracópodos (to) y la papila caudal (pc) (Fig. 9

G). El cuerpo de la larva metanauplio es triangular (vista lateral) mostrando una pequeña joroba en la parte dorsal donde se está formando el proto-abdomen de la larva caliptopis 1 (Fig. 9 H). El metanauplio ya tiene glándula digestiva (gd) el intestino se está desarrollado aunque aún no sea funcional (poi). La metamorfosis del sistema digestivo debe ser rápida para que la caliptopis 1 pueda ingerir alimento una vez que se abra la boca y el ano (primera alimentación exógena).

Las larvas metanauplio permanecen en el saco ovífero incrementando su tamaño a tal punto que todos los embriones se oscurecen e incrementan notablemente el volumen del saco ovífero. Los metanauplios salen del saco ovífero entre 96 y 144 h después del desove (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Incluso una ligera manipulación de las hembras ovíferas libera los embriones metanauplios debido a que el saco ovífero se adelgaza y se rompe fácilmente la membrana transparente liberando a los metanauplios para iniciar su fase larvaria de vida libre. Los metanauplios nadan velozmente y aún tienen considerable reserva de lípidos en la parte dorsal 40% en promedio.



**Figura 9.** Desarrollo de los estadios larvares nauplio, pseudometanauplio y metanauplio de *Nyctiphanes simplex*, ubicados en el saco ovigero. **A)** Nauplio. **B)** Nauplio corte longitudinal sagital. **C)** Nauplio corte longitudinal frontal. **D)** Acercamiento de las células nerviosas y músculo (m) del Nauplio. **E)** Pseudometanauplio en corte longitudinal sagital. **F)** Corte longitudinal frontal del estadio pseudometanauplio. **G)** Corte longitudinal frontal de metanauplio. **H)** Corte longitudinal sagital de metanauplio. a1 = primera antena, a2 = segunda antena, abd = abdomen, an = región anterior, cn = células nerviosas, cnc= cordón nervioso central, do = zona dorsal, gd = glándula digestiva, hlf = hemolinfa, lb = labrum, lc = lóbulo de la cabeza, m = músculo, md = mandíbula, mx = maxila, pc = papila caudal, pgd = primordio glándula digestiva, pi = primordio de intestino, po = zona posterior, poi = posible intestino, to = toracópodo, ve = zona ventral. Escala de la barra = 100 µm.

**Caliptopis.** Cuando los metanauplios nadan libremente en la columna de agua, estos se transforman sin liberación de exoesqueleto en caliptopis en un periodo que varía entre 30 minutos y 10 horas. De esta forma la transformación de MN a C1 no existe *sensu stricto* un proceso de muda (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Es decir, la transformación de matanauplio a caliptopis se realiza por rompimiento de la cutícula para extender el abdomen pero no se desecha el exoesqueleto para dar origen a la larva caliptopis 1. El abdomen del metanauplio se desdobra y se extiende hacia la parte posterior dando lugar a la característica forma del estadio caliptopis 1 de cefalotorax cubriendo los ojos y un abdomen largo y tubular insegmentado.

Las larvas caliptopis 1 tienen grandes áreas con tejido muscular estriado, tejido nervioso bien desarrollado, mostrando un desarrollo funcional del intestino y la glándula digestiva (Fig. 10 A, B). El tejido muscular se dispone a lo largo de todo el cuerpo orientado en diferentes direcciones, pero los músculos más evidentes son aquellos que accionan los apéndices cefálicos y aquellos ubicados en la parte anterior del abdomen. En un acercamiento de los apéndices de la larva caliptopis 1 se detectan los paquetes musculares. El músculo estriado se encuentra en la parte ventral de la larva C1 y en sus apéndices. En ambos casos, se detectaron bandas claras "I" y bandas oscuras y gruesas "A" características del músculo estriado (Figs. 10 C y D).

La región neural de la caliptopis 1 incluye un par de ganglios ventrales que forman el tritocerebro resultado de la fusión de un par de ganglios de origen post-oral. El titrocerebro se conecta con los segmentos mandibulares y existe un par de ganglios formados en cada segmento. La porción central del sistema neural de la

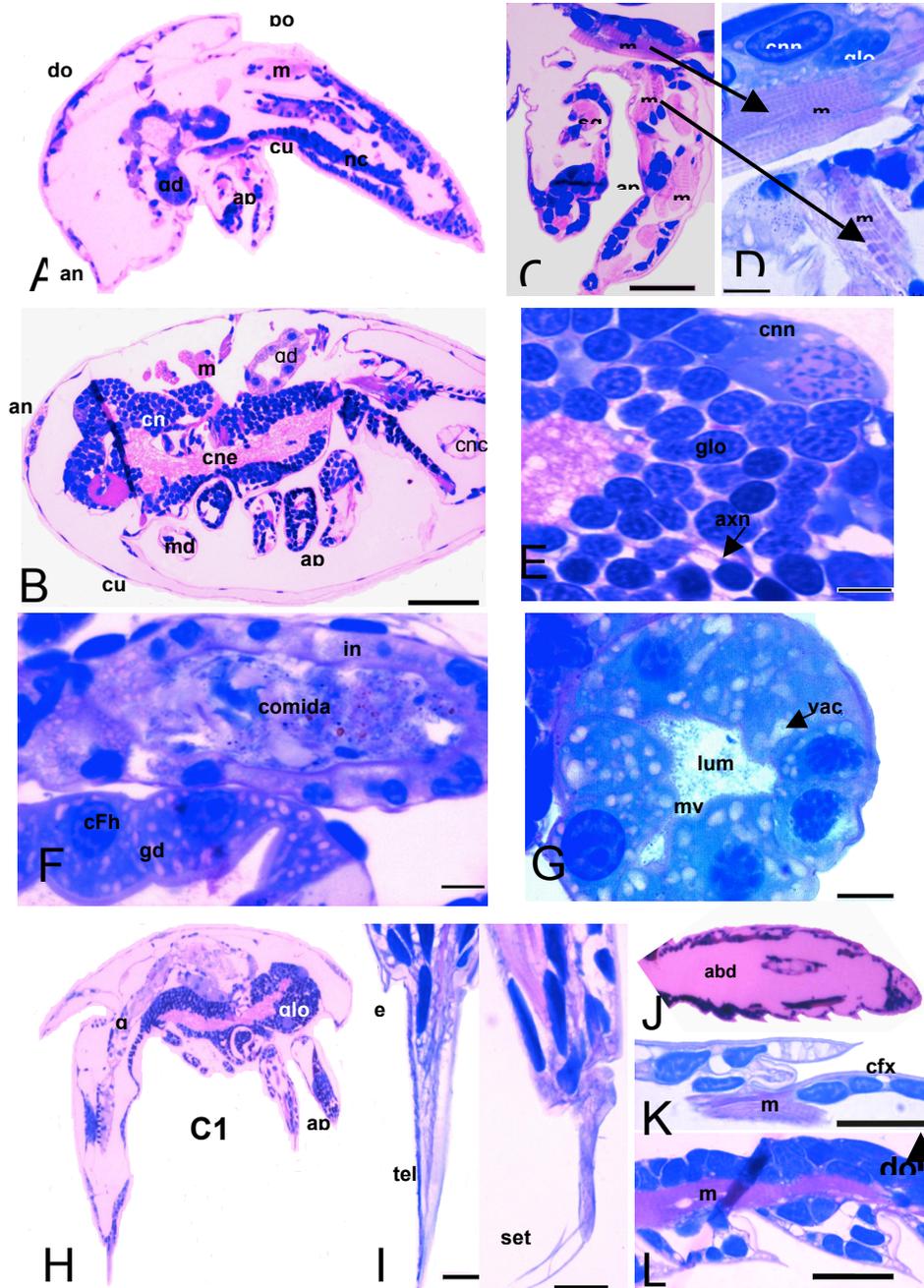
caliopsis 1 contiene inervaciones ventrales del cordón nervioso central (cnc) y los ganglios laterales (Fig. 10 E). Se encontraron dos tipos de células nerviosas, las globulares (glo) y las neurosecretoras (cnn). Las células nerviosas globulares presentan grandes núcleos con cromatina condensada y las células nerviosas neurosecretoras, de mayor tamaño celular, presentaron abundante citoplasma granular con núcleo grande y bien definido (Fig 10 E).

El intestino de la caliopsis 2 esta conformado por tejido conectivo y tiene epitelio mucoso en el interior, en el área del lumen de las caliopsis recolectadas directamente del campo o de las caliopsis incubadas con alimento (mezcla de fitoplancton filtrado en malla de 20  $\mu\text{m}$ ) se puede detectar restos de alimento, aunque no es posible reconocer taxonómicamente su contenido estomacal (Fig. 10 F).

La glándula digestiva (hepatopancreas), también detectada en el estadio caliopsis 1, puede variar su tamaño dependiendo de la calidad y cantidad de la alimentación reciente. El hepatopáncreas está constituido por una formación glandular tubular compuesta. A partir de la larva caliopsis cada túbulo representa una unidad funcional debido a que ésta ya se alimenta exógenamente y está compuesto por células vacuoladas delimitadas por tejido conectivo y en el interior tienen un lumen rodeado de gran número de microvellosidades (mv). Se pueden observar algunas células en mitosis. En las larvas caliopsis 2 se observan células de absorción y almacenaje denominadas células R (cR) que se caracterizan por tener en el citoplasma numerosas vacuolas y células fibrosas F (cF) que contienen un núcleo más grande que el de las células R. Las células B no fueron detectadas en los cortes histológicos analizados de las caliopsis (1-3) de *N. simplex*, sin embargo,

se han reportado que funcionan como secretoras y que contienen una vacuola grande en la glándula digestiva de otros crustáceos (Fig. 10 F).

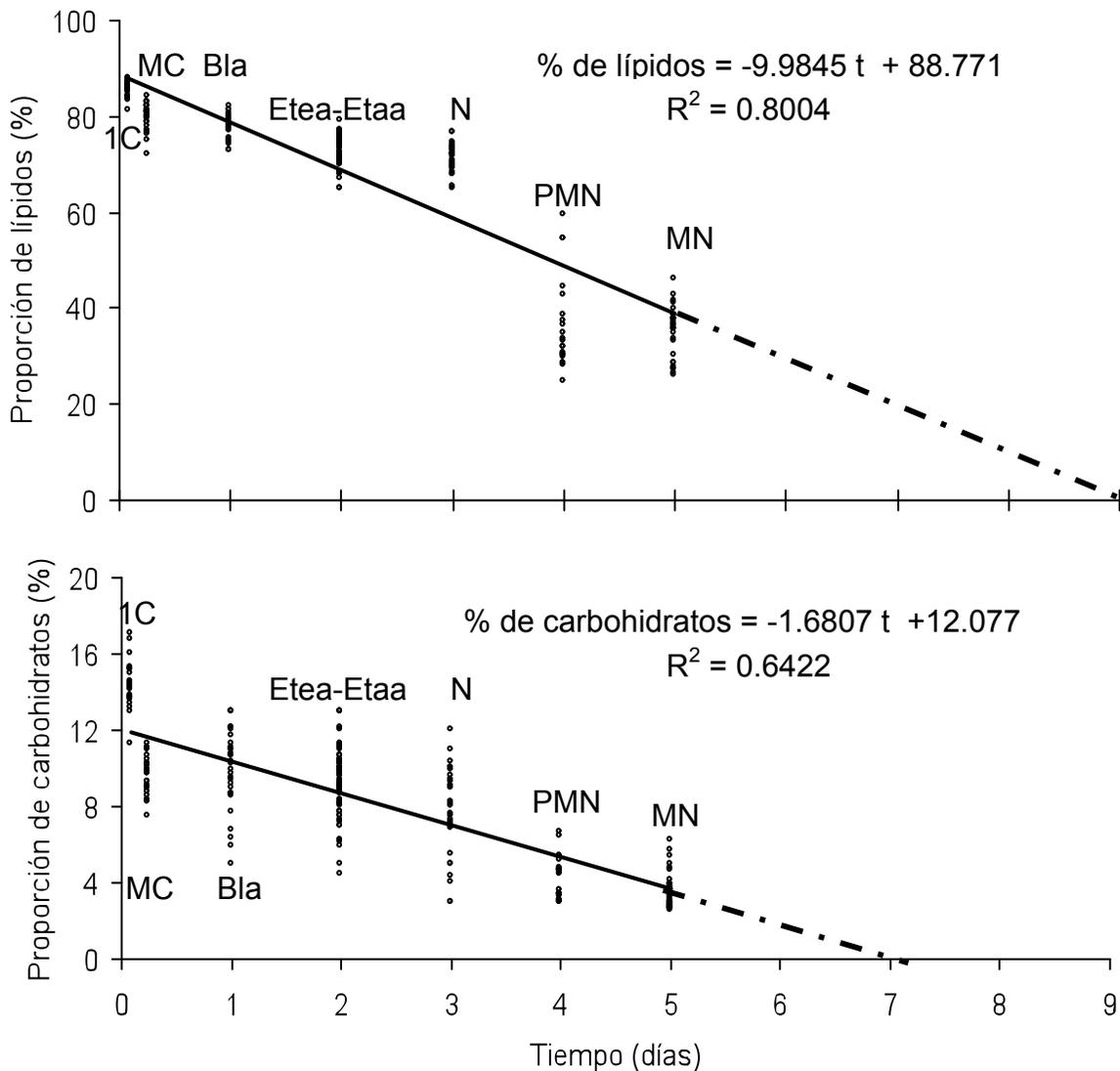
La larva caliptopis 3 en corte sagital muestra el intestino a lo largo del cuerpo y con alimento (Fig. 10 F). El nivel del corte permite observar el telson (tel) y una espina (e), incluso las setas de los apéndices (Fig. 10 I). Aunque en organismos vivos se observa externamente que la caliptopis 2 tiene el abdomen segmentado, los cortes histológicos no muestran una clara segmentación indicando que ésta inicia cerca del tegumento y sigue hacia el interior del abdomen. Esta formación de segmentos abdominales fue evidente en cortes histológicos hasta la larva caliptopis 3 (Fig. 10 J). En cada segmento se observa una extensión de la cutícula, células nerviosas, tejido conectivo y músculo (m) tanto en la parte dorsal (Fig.10 K) como en la parte ventral de la caliptopis 3 (Fig. 10 L).



**Figura 10.** Cortes histológicas de larva caliptopis 1, 2 y 3 de *N. simplex*. A) Corte sagital de caliptopis 1 (C1) completa. B) Corte longitudinal frontal de C1, área del cefalotórax. C) y D) Paquetes de musculares de los apéndices. E. Región cefálica. F. Intestino con alimento y parte de glándula digestiva. G) Glándula digestiva. (hepatopáncreas) de la larva caliptopis 1. H) Corte sagital de larva caliptopis 2. I) Telson, espina y setas de apéndice de Caliptopis 2. J, K y L) Segmentos abdominales de la caliptopis 3. J) Segmentos abdominales. K) Segmentos zona dorsal. L) Segmentos zona ventral. abd = abdómen, an = zona anterior, ap = apéndices, axn = axones, cFh = células F del hepatopáncreas, cfx = cefalotórax, cn = células nerviosas, cne = cordón nervioso, cnn = células nerviosas neuro-secretoras, cu = cutícula, do = zona dorsal, e = espina, gd = glándula digestiva, glo = células nerviosas globulares, in = intestino, lum = lumen, m = músculo, md = mandíbula, mv = borde de microvellosidades, po = zona posterior, set = setas, sg = segmento de ganglio, vac = vacuola, ve = zona ventral, tel = telson. Escala de barra = 10 µm, excepto B (100 µm) y D (50 µm).

## Proporción de lípidos y carbohidratos en embriones y larvas

Los embriones de *N. simplex* tuvieron una significativa disminución en la proporción de lípidos durante su embriogénesis, disminuyendo cerca de 60 % desde estadio de una célula hasta la eclosión en estadio nauplio dejando una reserva lípidica de aproximadamente el 40% al momento de que el MN se libera del saco ovífero.



**Fig. 11.** Proporción de área de acumulación de A) lípidos totales y B) carbohidratos en relación al área total de los embriones de *N. simplex* estimados mediante métodos histoquímicos y análisis digital de imágenes.

## **Proceso de muda de las larvas dentro del saco ovígero de las hembras**

Se intentó distinguir si los embriones dentro del saco ovígero mudaban una vez que los embriones eclosionaron como nauplio para después transformarse en pseudometanauplio y posteriormente en metanauplio. Se buscó cualquier evidencia de mudas descartadas dentro del saco ovígero con múltiples larvas (6-108 embriones) pero no se encontró ninguna cutícula. Esto indica que las larvas dentro del saco ovígero no realizan proceso de ecdisis (sin mudar o al menos sin desechar una exuvia). Esta transformación de estadios sin muda ya había sido observado de metanauplio a caliptopis 1 (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Esta estrategia de desarrollo posiblemente ha evolucionado por el escaso espacio que tienen los embriones para deshacerse de un exoesqueleto en el saco ovígero y posiblemente para evitar proliferaciones de bacterias que degraden exuvias dentro del saco ovígero. En el estadio de Etea y Etaa se observó claramente el corion y probablemente una cutícula, pero muy delgada, la cual es difícil de distinguir incluso en un aumento de 100x (Fig. 12 A).

En los embriones en estadios de N, PMN y MN se pudo distinguir una epicutícula delgada de color morado o magenta alrededor del cuerpo de los embriones que sugiere que esta compuesta con relativamente pocas fibras de colágeno, pero no se distinguió ninguna otra capa o subcapa (Fig. 12 B). En las larvas caliptopis 1-3, la cutícula fue relativamente más gruesa, sin embargo, aún no se pueden distinguir las capas y subcapas del exoesqueleto. Esto sugiere que la cutícula se constituye con una sola capa que apoya la idea que las larvas dentro del

saco ovígero no mudan ni entran en un ciclo de mudas típico de estadios de vida libre (caliopsis, furcilia, juveniles y adultos) (Fig. 12 C).

### **Proceso de muda de las hembras ovígeras**

Por su simplicidad y utilidad práctica el ciclo de muda de las hembras de *N. simplex* se dividió en los 3 estadios descritos por Buchholz (1982): postmuda (A), intermuda (B-C) y premuda (D). En el campo se identificó el estadio de muda de la hembra ovígera justamente antes de preservar las hembras para tener una pre-identificación del estadio de muda antes de realizar los cortes histológicos. A nivel histológico se caracterizó cada uno de estos estadios: **estadio A** de post-muda en el que sólo se distinguen la epicutícula y la procutícula (sin distinguir ninguna subcapa de la procutícula); **estadio B-C** de intermuda, donde se detecta claramente la epicutícula, pero en la procutícula (compuesta por tres capas) solamente se pueden distinguir dos de ellas (la exocutícula y la endocutícula), no se pudo distinguir una capa membranosa y **estadio D** de premuda, se pueden identificar cinco capas que son las viejas epicutícula, exocutícula y endocutícula y las nuevas epicutícula y exocutícula.

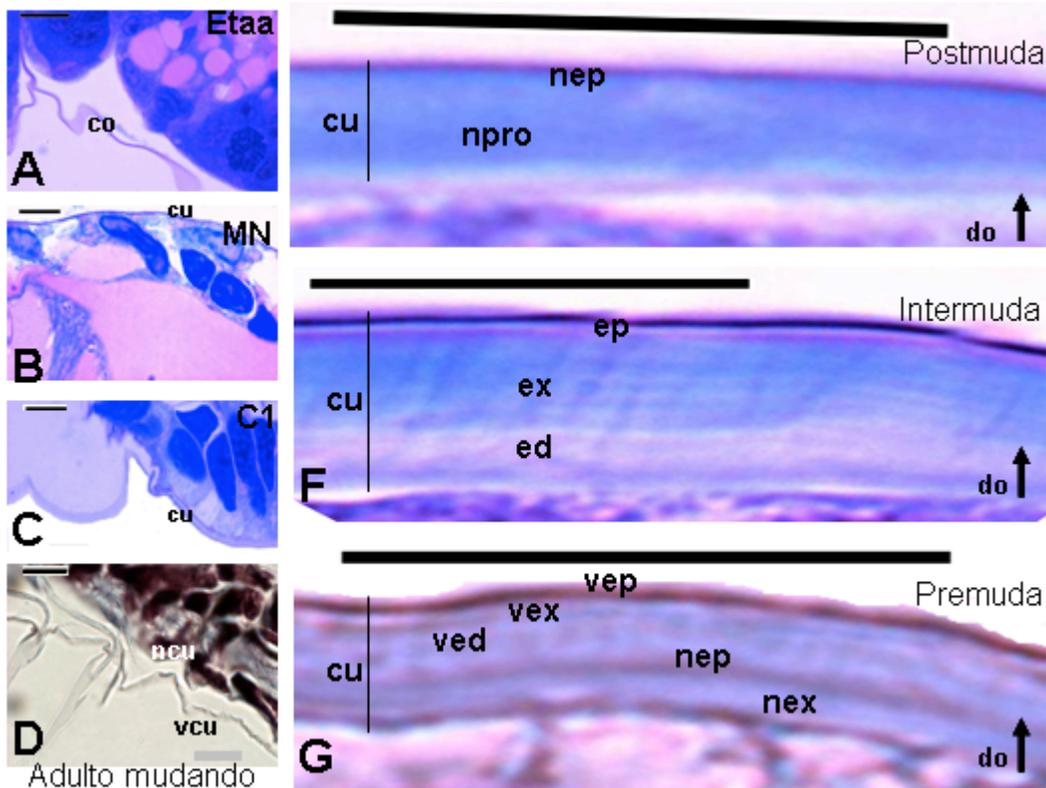
**Estadio de postmuda (A):** Una de las hembras de *N. simplex* incubadas murió durante el proceso de muda. En los cortes histológicos se observó la cutícula vieja (con todas sus subcapas) completamente desprendida del cuerpo y la nueva cutícula (con todas sus subcapas) adherida sobre la epidermis (Fig. 12 D). De la nueva cutícula, la epicutícula se tiñió de color rojo o magenta y la procutícula se tiñió de color azul (color de la tinción con afinidad al colágeno). Esto significa que la epicutícula probablemente no contiene fibras de colágeno, pero el colágeno es el

principal componente de la procutícula que provee su característica rigidez del exoesqueleto. El patrón de dos capas se observó típicamente en hembras ovígeras en posmuda temprana (estadio A) (Fig. 12 E) con embriones de una célula hasta embriones en blástula.

**Estadio de intermuda (B-C):** La cutícula madura está conformada por cuatro capas: la epicutícula (ep), exocutícula (ex), endocutícula (ed) y la capa membranosa (estas últimas tres conforman la procutícula) de las cuales no se pudo distinguir la capa membranosa (Fig. 12 F). En las hembras de *N. simplex* en intermuda la epicutícula se tiñó de color magenta con PAS indicando la presencia de carbohidratos. Considerando la intensidad de la coloración magenta, se confirma que la epicutícula contiene altas concentraciones de carbohidratos y con la tinción tricómica se detecta que no contiene fibras de colágeno. La exocutícula se tiñó de azul intenso con la tinción tricrómica de Masson y de rosa con PAS indicando que está compuesta por numerosas fibras de colágeno unidas a una matriz compuesta por carbohidratos y proteínas. La endocutícula se tiñó de un azul claro con la tricrómica y de rosa con PAS, indicando una composición con menor proporción de fibras de colágeno y carbohidratos que la exocutícula. Con ninguna de las tinciones usadas se pudo distinguir una capa membranosa posiblemente por que ésta es muy delgada o posiblemente porque su composición es semejante al de la endocutícula. Durante el estadio de intermuda (estadio B-C) las hembras se observaron con embriones en estadios entre SC hasta MN.

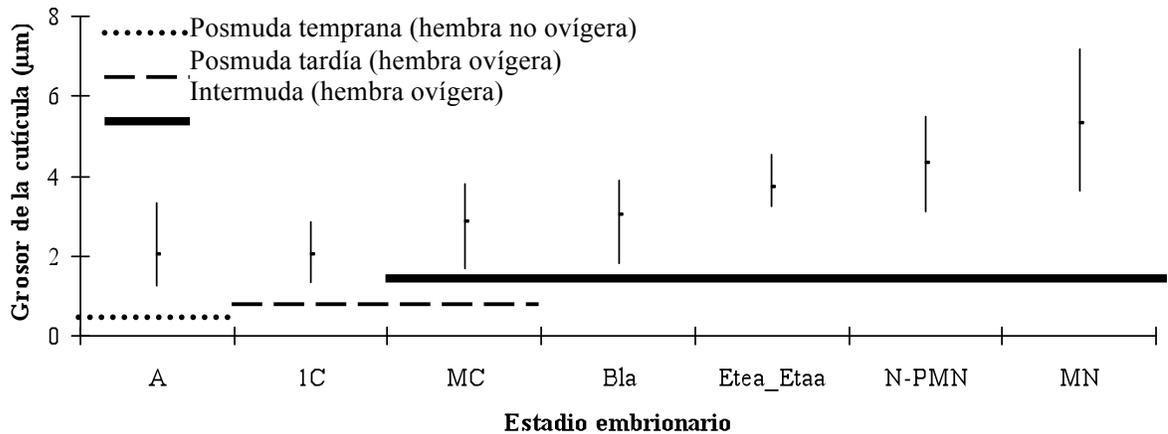
**El estadio de premuda (D).** En el estadio premuda se observaron cinco capas: epicutícula, exocutícula y endocutícula viejas y las nuevas epicutícula y exocutícula (Fig. 12 G). Los estadios de intermuda B-C y premuda D se observaron

en hembras que ya habían liberado los embriones en estadio MN, de esta forma se puede generalizar que todas las hembras de *N. simplex* con saco ovífero están en estadio de intermuda.



**Figura 12.** Imágenes de la cutícula de Etaa, MN y C1 y estadios del ciclo de muda de las hembras ovíferas de *N. simplex*. A) Cutícula estadio Etaa B) Cutícula de metanauplio. C) Corte de caliptopis. D) Corte de adulto mudando. E) Corte de adulto en estadio de posmuda. F) Cutícula de hembra ovífera en intermuda. G) Cutícula de hembra en estadio de premuda. co= corion, cu=cutícula, do=zona dorsal, ep=epicutícula, ex=exocutícula, ed=endocutícula, ncu= nueva cutícula, nep=nueva epicutícula, nex=nueva exocutícula, pro=procutícula, vcu=vieja cutícula, ved=vieja endocutícula, vep=vieja epicutícula, vex=vieja exocutícula. Escala de barra = 10 µm.

Durante la intermuda, las capas de la procutícula son poco distinguibles, sin embargo, el grosor de la cutícula aumenta conforme se desarrollan los embriones y las larvas dentro del saco ovífero de *N. simplex* (Fig. 13).



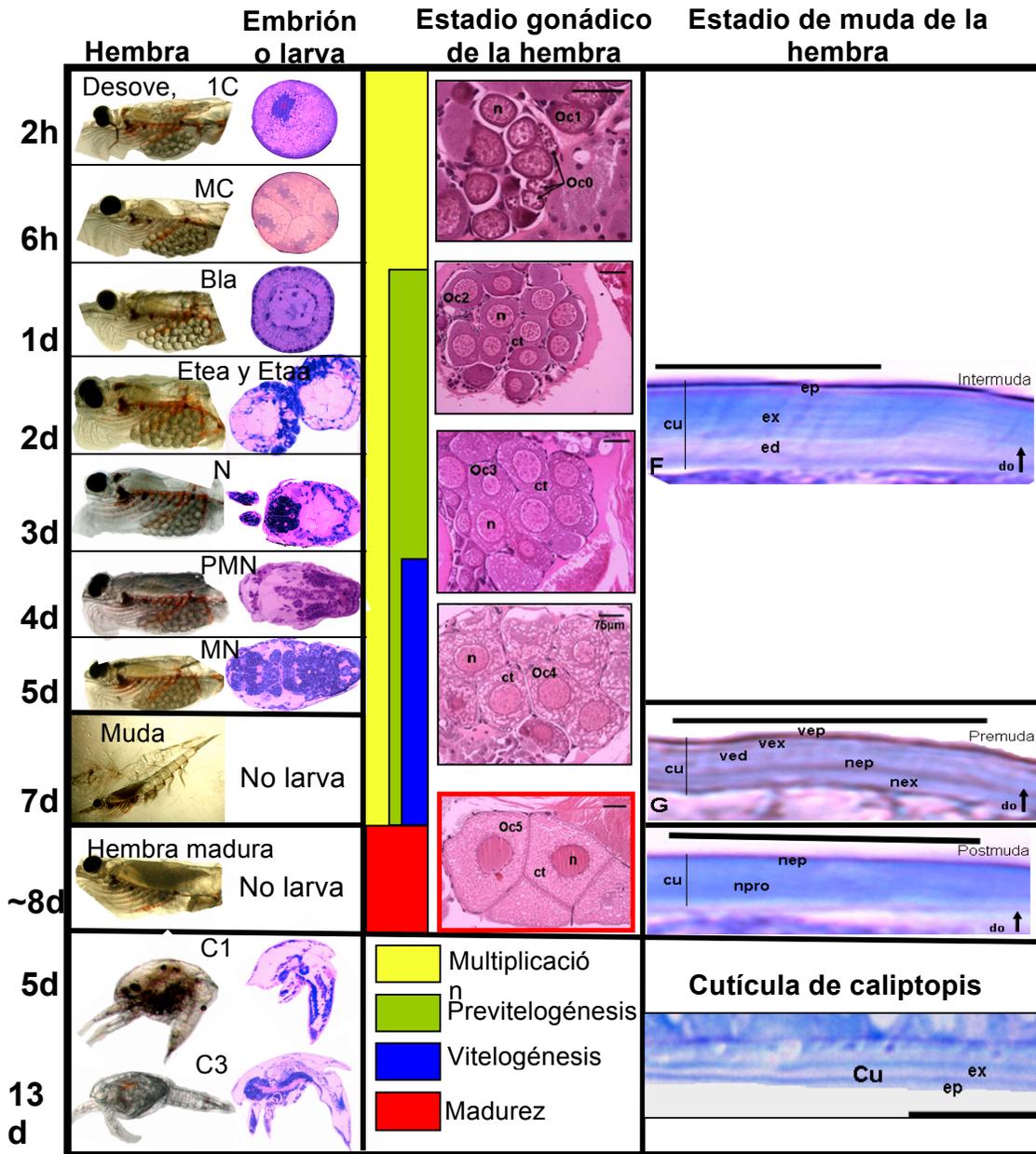
**Fig. 13.** Grosor de la cutícula de las hembras en relación con los estadios de desarrollo de los embriones y larvas en su saco ovífero. Valores promedio, máximos y mínimos.

**Modelo conceptual de la interacción temporal entre los procesos de embriogénesis, desarrollo larvario dentro del saco ovífero con el ciclo de muda y ovogénesis de la hembra ovígera.**

Las hembras ovígeras sincronizan sus ciclos gonádico y de muda con el desarrollo de los embriones en su saco ovífero con una temporalidad que obedece a una secuencia que usualmente se comparte entre hembras (con pocas excepciones). El periodo de interpuesta (PIP) más breve de hembras de *N. simplex* observado en incubaciones experimentales fue de 7 días (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). Las hembras normalmente mudan 1-2 días después de liberar los embriones en estadio MN. Solo en una ocasión se observó que la hembra ovígera mudó antes de liberar

los embriones de su saco ovífero. El ciclo gonádico de las hembras de *N. simplex* fue dividido en seis estadios (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010 b): 1) Multiplicación, la oogonia se multiplica por mitosis y se agrupa en zonas germinales localizadas en la periferia de la gónada (Oc0); 2) Previtelogénesis, incluye ovocitos de nucleolos de cromatina temprana (Oc1) y tardía (Oc2); 3) Vitelogénesis, tiene en su mayoría ovocitos de forma poligonal, con glóbulos de aceite (Oc3 y Oc4) precursores del vitelo; 4) Madurez, los ovocitos están llenos de gránulos de vitelo que alcanzan su talla máxima; 5) Desove, cuando la vesícula germinal se rompe (Oc6) y los gránulos de vitelo inmersos son menos densos y 6) Absorción, las células tienen forma irregular y ya no tienen función reproductiva (Oc7). Este desarrollo secuencial del ciclo gonádico ocurre simultáneamente en relación al desarrollo de los embriones en el saco ovífero. Cuando los embriones están entre una célula y desarrollo tardío de apéndices, la gónada de la hembra esta en estadio de multiplicación. A partir de la eclosión de los nauplios, la gónada puede seguir en multiplicación o en previtelogénesis (nunca se ha observado una hembra ovígera con gónada gravida color rosa). La hembra muda entre 24 y 48 h después de completar la liberación de los metanauplios del saco ovífero y posteriormente ocurre la madurez de la gónada seguida del desove. De ésta forma, la hembra ovígera madura, desova y mientras los embriones se desarrollan en el saco ovífero, la gónada entra en un nuevo ciclo de ovogénesis. Las hembras ovígeras siempre están en estadio de intermuda, cuando sucede la liberación de los embriones, la hembra puede mudar y después madurar la gónada para producir una nueva puesta (Fig. 14). Este modelo conceptual sugiere que las hembras sincronizan sus procesos de desarrollo de gónada y mudas con la puesta y desarrollo embrionario para maximizar el éxito reproductivo y cuidado

parental lo más eficientemente posible en términos de utilización energética secuencial entre procesos.



**Fig. 14.** Modelo conceptual de la secuencia temporal y asociación de los procesos de desarrollo embrionario y los ciclos gónadico y de muda de las hembras de *N. simplex*. 1C = una célula, Bla = blástula, C1 = caliptopis 1, C3 = caliptopis 3, ct = citoplasma, cu = cutícula, do = zona dorsal, ed = endocutícula, ep = epicutícula, Etaa = estadio de desarrollo tardío de apéndices, Etea = estadio de desarrollo temprano de apéndices, ex = exocutícula, MC = múltiples células, MN = metanauplio, N = nauplio, n = núcleo, nep = nueva epicutícula, nex = nueva exocutícula, Oc = ovocito, PMN = pseudometanauplio, ved = vieja endocutícula, vep = vieja epicutícula, vex = vieja exocutícula. Escala de barra de gónadas 100 µm. Escala de barra de cutícula 10 µm.

## ANÁLISIS

*N. simplex* tienen una compleja interacción de procesos sincronizados en tiempo que permite maximizar fisiológicamente la energía de las hembras. Esta sincronización es resultado de un proceso evolutivo que permite que una hembra desove y mientras los embriones se desarrollan la hembra re-inicie su desarrollo gonádico, de tal forma que al liberarse los embriones del saco ovífero la hembra entra en un proceso de muda. Al finalizar la écdisis la hembra alcanza su estadio de gavidéz rápidamente para desovar el siguiente saco ovífero. La desventaja es que si la hembra llega a ser depredada se pierde la totalidad de su última puesta. Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio detallado de la embriogénesis interna de cualquier especie de eufáusido con reproducción en saco ovífero y puede ser un punto de partida para generalizar patrones de desarrollo embrionario, larvario y gonádico de las 26 especies con este tipo de reproducción conocidas en el Orden Euphausiacea. A continuación se discute cada uno de estos procesos en relación al conocimiento previo obtenido de especies de krill con estrategia de desove externo.

### **Desarrollo embrionario dentro del saco ovífero**

En los crustáceos de la Clase Malacostraca, algunos taxa como Amphipoda, Dendrobranchiata (suborden del Orden Decapoda) y Euphausiacea presentan división celular holoblástica (Alwes & Scholtz, 2004, Biffis et al., 2009). Es decir, que en cada división del embrión participa todo el cigoto y en teoría estos embriones típicamente tienen relativamente poco vitelo en relación a huevos con división

meroblastica. Taube (1909, 1915) mencionó que los eufáusidos tienen una división en espiral que sugiere similitudes entre la división celular de Euphausiacea y los decápodos Dendrobranchiata. Sin embargo, Alwes & Sholtz (2004) no encontraron evidencia de división en espiral en *M. norvegica*, demostrando que la división celular era como imagen en el espejo (segmentación total simétrica). *Nyctiphanes simplex* tiene un patrón de división semejante a lo observado en *M. norvegica* que sugiere una estrecha coherencia filogenética entre especies de eufáusidos con distinta estrategia reproductiva.

La controversia en las interpretaciones del modo de división temprana de los crustáceos son causadas principalmente por el insuficiente conocimiento de los linajes celulares (mapa celular) y del origen de las capas germinales en la mayoría de las especies investigadas, ahora relativamente bien conocidas para algunas especies de decápodos Dendrobranchiata (Hertzler & Clark, 1992; Hertzler 2002, 2005; Biffis *et al.*, 2009). En el caso de los crustáceos del Orden Euphausiacea, la única especie estudiada a nivel embriológico (interno) a sido *Meganyctiphanes norvegica* (Sars, 1886; Taube 1909, 1915) y a un nivel de mapa celular y linaje de células (Alwes & Sholtz, 2004). Se han realizado numerosas observaciones de embriones vivos (transparentes) en *Euphausia superba* (George, 1984), *E. pacifica*, *Thysanoessa spinifera*, *Thysanoessa inspinata* y *Nematoscelis difficilis* (Gómez-Gutiérrez, 2002, 2003, 2006; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010c) y *N. simplex* (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005).

Los análisis histológicos demuestran que *N. simplex* tiene un patrón de división celular (y probablemente linaje celular) semejante al de *M. norvegica* (desovador externo) lo que indica que los embriones de especies de krill con

estrategia de desove distinto tienen un patrón de división celular coherente en la familia Euphausidae. Algunas observaciones realizadas con tinción fluorescente en crustáceos decápodos (Orden Decapoda, Suborden Dendrobranchiata) y anfípodos (Orden Amphipoda) han revelado que los modos de división celular de éstos crustáceos son distintos en términos de patrón de división y linaje celular (Hertzler & Clark, 1992; Hertzler *et al.*, 1994; Hertzler, 2002, 2005).

Alwes & Sholtz (2004) mencionaron que poco después del desove de *M. norvegica* se forma un espacio previtelino entre la membrana y el embrión de aproximadamente 150 µm de grosor. En *N. simplex* este espacio es virtualmente imperceptible. A partir de cortes histológicos y observaciones de microscopio a bajo aumento (10x), este espacio perivitelino mide aproximadamente 10 µm de grosor. Esta diferencia en el espacio perivitelino puede ser por la necesidad de protección ante el medio en embriones de las especies de desove externo (Timofeev & Skya, 2001, Timofeev *et al.*, 2004). Las especies que forman saco ovífero protegen a los embriones oxigenándolos éstos han evolucionado a tener un espacio perivitelino extremadamente pequeño para maximizar el número de embriones en el saco ovífero (Nemoto *et al.*, 1972; Gómez-Gutiérrez 2002, 2003).

El corion es fácilmente detectable cuando el embrión deja de ser esférico como por ejemplo en el estadio temprano de apéndices (Etea). Al parecer no existe un incremento en la talla de los embriones durante las primeras divisiones celulares y es hasta el estadio nauplio cuando se inicia un aumento notable de diámetro y posiblemente la biomasa (volumen) de la larva en el saco ovífero.

En un estudio de observación directa de embriones vivos de *E. superba* la segunda división dió lugar a cuatro células, dos de éstas son claramente de menor

tamaño (segmentación total desigual) (George & Strömberg, 1985). En el caso de *M. norvegica*, la diferencia de tamaño de las células del embrión no es evidente. Los blastómeros son virtualmente del mismo tamaño hasta la formación de ocho células, excepto una célula que es relativamente más grande debido a que se demora en la división, se invagina durante la blástula y posteriormente es el área de arquenterón durante el estadio de gástrula formado por ocho células en forma de corona (Alwes & Sholtz, 2004). Estas mismas características de segmentación celular se observaron en los embriones de *N. simplex* hasta la etapa de blástula.

Dos de los grupos de crustáceos del Orden Malacostraca que tienen patrón de división total (holoblástica) son Euphausiacea y Dendrobranchiata. En el caso de *Sicyonia* (Dendrobranchiata), la gastrulación toma lugar después de la quinta división celular tangencial que forma 32 blastómeros. La gastrulación comienza con dos células que interrumpen su división y se invagina al blastoporo; una forma el vitelo del endodermo, la otra forma propiamente el endodermo y el mesodermo principal. Al dividirse el resto de los blastómeros, la invaginación de los dos blastómeros llena casi todo el blastocele. Los Dendrobranchiata tienen ocho ó nueve células (células de corona) alrededor del blastoporo que retrasan su división (Hertzler & Clark, 1992; Biffis *et al.*, 2009) a diferencia de los eupáusidos *M. norvegica* y *N. simplex* que tienen ocho células. Estas células han sido también llamadas “células Kranzzellen” que aparentemente sólo se dividen una vez más. Taube (1909, 1915) y Alwes & Sholtz (2004) mencionaron que los embriones de *M. norvegica* después de que forman 122 células, las 16 células hijas de Kranzzellen comienzan la gastrulación *sensu stricto*. Por el contrario, George & Strömberg (1985) mencionaron, mediante observaciones de embriones vivos del krill antártico, que *E. superba* realiza más

divisiones celulares antes de la gastrulación, de esta forma el estadio gástrula tiene >122 células.

La embriogénesis temprana de algunos grupos de malacostracos ha sido descrita detalladamente siguiendo el desarrollo en vivo y con tinción de fluorescencia (Hertzler & Clark, 1992; Alwes & Sholtz, 2004; Browne *et al.*, 2005; Hertzler, 2005; Biffis *et al.*, 2009). Sin embargo, raramente se describe la gastrulación y cuando se hace, ésta es usualmente breve mencionando únicamente la acumulación de células en un hemisferio del embrión (polo animal), las cuales forman una banda germinal. En algunos casos, como en cangrejos (Brachiuros) y langostas (Paniluridae), este estadio sólo se distingue por la presencia de la banda germinal en forma de U o V (Manton, 1928; Nagao *et al.*, 1999; Nazari *et al.*, 2000; García-Guerrero *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003; García-Guerrero & Hendrickx, 2006).

Los camarones peneidos tienen una gastrulación temprana que comienza con la invaginación de un par de blastómeros como en el caso de *P. kerathurus* en el que la gastrulación inicia en el estadio de 16 células, en *S. ingentis* que inicia en el estadio de 32 células y *P. japonicus* que inicia en el estadio de 64 células (Hertzler & Clark, 1992). En eufáusidos observados vivos, la gástrula se reconoce por la migración de células grandes hacia adentro del embrión, teniendo como resultado gran número de células ectodémicas y pocas células indiferenciadas en el interior del embrión, así como por la formación del blastoporo. Gómez-Gutiérrez & Robinson (2005) fotografiaron embriones de *N. simplex* en estadio gástrula pero en el presente estudio no fue posible detectar embriones en dicho estadio, posiblemente causado por su corta duración o por su organización tridimensional que podría dificultar la detección del blastoporo en los cortes histológicos (2D) para detectar las tres capas

embrionarias. En los eufáusidos el mesodermo está formado por dos células situadas enfrente de las células endodérmicas (Manton, 1928), ésta puede ser una razón más por la cual no es fácil observar las tres capas embrionarias a partir de observaciones histológicas.

A pesar de no poder observar y caracterizar directamente el estadio de gástrula, de las muestras preparadas histológicamente se observaron varios embriones en blástula con numerosas células ectodérmicas y entre cuatro y ocho células de mayor tamaño en el interior del embrión, así como un posible espacio que podría ser primordio del blastoporo.

Antes del estadio de desarrollo temprano de apéndices (Etea) de *E. superba* existe una proliferación de células ectodermales (George & Strömberg, 1985). En el interior del embrión, las células endodérmicas comienzan a formar el intestino alrededor de una masa central del vitelo, las células mesodérmicas se extienden a los segmentos naupliares y las células del sistema nervioso comienzan a proliferar. En los embriones de *N. simplex* en estadio Etea definitivamente existe una organización celular que inicia la organogénesis, sin embargo, en este estadio no se identificó ningún tejido completamente diferenciado.

### **Desarrollo larvario**

En la Clase Malacostraca, solo los crustáceos del Orden Euphausiacea y Decapoda (suborden Dendrobranchiata) tienen nauplios de vida libre; aunque en los eufáusidos los nauplios también pueden ser un estadio embrionario, particularmente cuando la eclosión es tardía (Gómez-Gutiérrez, 2002, 2003, 2006). El nauplio de estos dos taxa eclosionan de huevos con relativamente poco vitelo después de una

división total (holoblástica) con una gástrula por invaginación (Sholtz, 2000). El nauplio de vida libre se caracteriza por presentar tres pares de apéndices que son la primera antena (unirrameas), segunda antena y mandíbulas (birrámeas). Ninguno de estos apéndices naupliares (confirmado en *N. simplex*) es articulado, todavía no se forma un labrum, ni se distinguen estructuras como la boca, ano ó intestino (Taube, 1915; Zilch, 1978). Sin embargo, en los nauplios de *N. simplex* se observaron células nerviosas, músculos en las partes relacionadas con los apéndices natatorios y se detectaron células primordiales de la glándula digestiva que llegan a ser funcionales en el estadio caliptopis 1, cuando inicia la alimentación exógena.

Los nauplios de eufáusidos tienen cinco mecanismos de eclosión (Gómez-Gutiérrez, 2006), tres de estos: eclosión hacia atrás (N), eclosión hacia delante (PMN y MN) y por aleteo (C1) son utilizados en su mayoría por especies de desove externo. Los otros dos tipos de mecanismos se han observado exclusivamente en especies con desarrollo en saco ovífero: *Nematoscelis difficillis* que eclosiona con un mecanismo de empuje en donde los estadios PMN o MN extienden y contraen la primera y segunda antena rompiendo el corion casi a la mitad para eclosionar (Gómez-Gutiérrez, 2003). *N. simplex* siempre eclosiona como nauplio y lo hace mediante un método de expansión por crecimiento somático rompiendo el delgado corion conforme incrementa su volumen el cuerpo del nauplio (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005; Gómez-Gutiérrez, 2006). El corion aparentemente es degradado rápidamente dentro del saco ovífero por que los cortes histológicos no muestran evidencia de estos.

Algunos estudios han sugerido que la muda de crustáceos brachiuros puede ocurrir en los embriones dentro del saco ovífero detectando las delgadas mudas

incluso durante etapas embrionarias (Sasaki & Mihara, 1993). En *N. simplex* no se encontró evidencia histológica de que los embriones o las larvas (Nauplio, PMN, MN) muden dentro del saco ovífero. En las observaciones de los cortes histológicos se pudo detectar una posible epicutícula en los embriones, pero no se encontraron exuvias o restos de éstas dentro ni fuera del saco ovífero. Esto sugiere que los embriones y larvas pueden realizar metamorfosis dentro del saco ovífero sin realizar una ecdisis *sensu stricto*.

Los metanauplios al liberarse del saco ovífero se transforman en caliptopis 1 estirando el abdomen (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005). En el estadio caliptopis 2 detecta una segmentación del abdomen en organismos vivos y preservados; sin embargo, en cortes histológicos de caliptopis 2 no se detecta evidencia de segmentación interna. Esto sugiere que la segmentación inicia de la parte exterior hacia la parte interior posiblemente a partir de las células germinales. Los crustáceos malacostracos exhiben un estereotipo complejo y un patrón de división celular en el ectodermo y mesodermos de la parte posterior de la banda germinal que permite la proliferación mitótica y segmentación de los apéndices y el abdomen (Sholtz & Dohle, 1996).

En este estudio, a pesar de que no se realizaron observaciones con tinción fluorescente como en estudios previos (Hertzler & Clark, 1992; Hertzler *et al.*, 1994; Hertzler, 2002; Alwes & Scholtz, 2004; Biffis *et al.*, 2009), el uso de cortes histológicos permitió detectar claramente los núcleos y algunos detalles de las células como las regiones donde se acumulan los lípidos y los carbohidratos en el citoplasma.

Los lípidos y proteínas son la principal fuente de energía durante el desarrollo embrionario de los eufáusidos para efectuar el desarrollo de tejidos y otras funciones metabólicas (Amsler & George, 1985; Ju *et al.*, 2006). Aunque las proteínas son en términos de peso casi el doble del contenido de lípidos energéticamente parece que los lípidos y proteínas contribuyen con un porcentaje semejante al desarrollo u organogenesis de los embriones del krill Antártico *E. superba*, (Amsler & George, 1985). Los embriones de *N. simplex* tuvieron una disminución significativa en la proporción de lípidos durante la eclosión del nauplio. Esto puede implicar una elevada demanda de energía durante los procesos de diferenciación celular y de crecimiento (inicio de la organogénesis) que ocurren en los estadios larvarios de PMN y MN. La reserva de lípidos alcanza 40% al momento de que el MN deja el saco ovífero.

Los lípidos son componentes estructurales de membranas celulares y fuente de ácidos grasos esenciales, en particular los triglicéridos son el principal proveedor de energía durante el desarrollo embrionario (Coutteau *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 2006). Los embriones de *N. simplex* van disminuyendo su cantidad de lípidos de reservas conforme se va desarrollando la organogénesis (Fig. 14). Esta disminución es consistente con la disminución de lípidos detectada cuantitativamente en embriones de *E. superba* (Amsler & George, 1985) y de *E. pacifica* y *T. spinifera* (Ju *et al.*, 2006). La cantidad de reservas lipídicas en el estadio MN es fundamental para entender o estimar el periodo-de-no-retorno (PNR) y la subsecuente probabilidad de sobrevivencia de las larvas, una vez que inician su alimentación exógena en el estadio caliptopis 1.

Ikeda (1984b) concluyó que los estadios larvarios de *E. superba* se caracterizan por tener elevadas tasas metabólicas específicas al peso de los organismos y bajo contenido de almacenamiento de energía en el cuerpo. Un huevo seco de *E. superba* contiene 55.1 % de carbón, lo que indica un modo de nutrición lecitotrófico limitado en los estadios tempranos de larvas. Él estimó que la caliptopis 1 de *E. superba* puede sobrevivir solo 6 días sin alimento (Ikeda, 1984a). Si tomamos en cuenta que los embriones pierden aproximadamente el 60 % de los lípidos al llegar a PMN, considerando la tasa de disminución entre estadios (pendiente) se estima que la C1 de *N. simplex* tiene aproximadamente 96 horas (4 días) antes de quedarse sin reservas de lípidos. Sin embargo, el PNR debe ser considerablemente mas breve aunque se requiere investigar esto mediante estudios en laboratorio de consumo de oxígeno, metabolismo y contenido de lípidos de larvas tempranas de krill (Ross & Quetin, 1989).

Aunque los carbohidratos no son una fuente de energía fundamental para la embriogénesis de organismos acuáticos, éstos son particularmente esenciales para la síntesis de compuestos específicos como la quitina requerida para la formación del exoesqueleto (Holland, 1978). Las bajas proporciones de carbohidratos detectadas mediante métodos histoquímicos en los embriones de *N. simplex* coinciden con estimaciones directas de carbohidratos analizados en *E. superba* (Amsler & George, 1985), *E. pacifica*, *T. spinifera* (Ju *et al.*, 2006), decápodos (Biesot & Perry, 1995; García-Guerrero *et al.*, 2003; García-Guerrero, 2009) y larvas de peces (Sargent *et al.*, 1999). Amsler & George (1985) detectaron un aumento del 38% en la cantidad de carbohidratos desde el estadio gástrula hasta el estadio de desarrollo temprano de apéndices de *E. superba*, aunque no pudieron explicar la razón de este aparente

aumento en concentración de carbohidratos, particularmente que se asume una alimentación endógena obligada.

La tasa de disminución porcentual del área del embrión con carbohidratos (pendiente =  $-1.6\% \text{ d}^{-1}$ , interpretada como utilización metabólica hasta el estadio MN) fue más rápida que la tasa de disminución detectada en lípidos ( $-9.9\% \text{ d}^{-1}$ ) (Fig. 11). Esto implica que si estas tasas de utilización continúan después del estadio MN, las reservas energéticas de la caliptopis 1 bajo condiciones de inanición (conocido como el PNR) podría estar primeramente limitado por los carbohidratos. Considerando las tasas observadas, los carbohidratos en la caliptopis 1 pudieran llegar a niveles críticos en 48 h después de su transformación de metanauplio a caliptopis 1.

Los cortes histológicos mostraron alimento en el intestino de las larvas caliptopis, aunque no con una resolución que permitiera identificar el tipo de alimento ingerido. Suh *et al.* (1991) observaron, con microscopía electrónica, que la dieta de las caliptopis de *E. pacifica* en el Mar Amarillo está constituida principalmente de detritus orgánico, remanentes de crustáceos y partículas inorgánicas. Esto podría demostrar que las caliptopis tienen un amplio espectro trófico para evitar un estado de inanición que conlleve al PNR.

### **Muda de la hembra ovígera**

Para los organismos es necesario establecer una relación dinámica y funcional entre los procesos de reproducción (desarrollo gonádico y producción de huevos), muda y crecimiento somático con las condiciones ambientales y alimenticias

(Zelikman, 1957; Poleck & Denys, 1982; Dalpadado & Ikeda, 1989; Buchholz, 1991; Feinberg & Peterson, 2003; Buchholz *et al.*, 2006). Nicol (1989) mencionó que los eufáusidos son especies poco calcificadas (adaptación evolutiva para habitar en el ambiente pelágico) con rápidos periodos de intermuda (entre 2-7 días) y baja sincronización entre los procesos de crecimiento y reproducción. Esta interpretación fue realizada con base en el conocimiento previo hasta entonces conocido de especies con estrategia de desove externo. A diferencia de otras especies de desove externo, las hembras de *N. simplex*, con estrategia en saco ovígero, tiene una relativa alta sincronización entre los procesos de crecimiento, muda y la reproducción. Esto es apoyado con los resultados de que las hembras ovígeras mudan y maduran la gónada solamente después de haber liberado sus embriones MN del saco ovígero y los tiempos de periodo de intermuda, desarrollo embrionario y maduración de la gónada suceden temporalmente de manera sistemática (en la mayoría de las ocasiones con el mismo orden temporal). Las hembras de *N. simplex* tiene una cutícula de entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  de grosor, según el estadio del ciclo de muda (Fig. 12). Esto dificulta la identificación y caracterización de algunas de las capas de la cutícula de las hembras ovígeras y por supuesto también de los embriones y larvas dentro del saco ovígero.

Todas las especies de eufáusidos estudiadas hasta ahora tienen periodos de intermuda (PIM) del orden de 2 a 7 días (Stuart, 1992; Feinberg *et al.*, 2007); aunque en estudios con *E. superba* han encontrado PIM de 13 a 23 días. Como regla general, cuando los eufáusidos terminan su periodo de máxima reproducción y desove, el periodo de intermudas es en promedio, más corto (Buchholz *et al.*, 1996). Martínez-Gómez (2009) observó que individuos de ambos sexos de *N. simplex*

tienen PIM entre 3-7 días, el menor PIM ocurre en machos y hembras inmaduras mientras que las hembras grávidas sistemáticamente mudaron en > 7 días. Esta diferencia metabólica es necesaria para incorporar en modelos de producción secundaria de la población.

El periodo de interpuesta (PIP) de *N. simplex*, definido como el periodo entre dos desoves sucesivos, es entre 7 y 16 días. Las hembras generalmente mudan un día después de liberar los embriones MN del saco ovígero (aproximadamente 5 días después del desove) y maduran la gónada (color rosa) al sexto día, desovando el séptimo u octavo día. Todas las hembras ovígeras desarrollaron gónada en fase I a las primeras 21 h después del desove cuando los embriones se encontraban entre una célula (cigoto) a mórula. El 60 % de las hembras ovígeras desarrollaron gónada II entre 21 y 82 h con embriones entre blástula y nauplio, el resto a las 116 h con embriones en PMN y MN. Sólo el 22 % de las hembras ovígeras presentó gónada III (en previtelogénesis) y MN al mismo tiempo. Esta última es la proporción de hembras ovígeras que pueden desovar inmediatamente después de liberar los embriones (PIP 6-8 d), ya que el resto de las hembras vuelven a desovar en periodos >9 días (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010b).

La sincronización precisa de los procesos de desove y muda de los eufáusidos sigue aún en debate, particularmente porque no se ha podido concluir que el desove coincida con un estadio de muda específico (Nicol, 1989; Feinberg *et al.*, 2007). El proceso de muda parece no estar sincronizado en especies de krill con desove externo (Feinberg *et al.*, 2007; Nicol, 1989; Nicol *et al.*, 1995). Ocasionalmente las hembras mudan el mismo día que desovan, pero con mayor frecuencia ocurre después del desove. Tarling & Cuzin-Roudy (2003) encontraron en observaciones de

campo que *M. norvergica* desova durante la intermuda tardía y la premuda temprana, pero el desove nunca coincidió con el proceso de muda *sensu stricto* (ecdisis) seguramente por el enorme gasto energético que involucra realizar ambos procesos y la vulnerabilidad a depredadores si ambos procesos ocurren simultáneamente. Se ha observado que *E. pacifica* tiene varias mudas entre desoves (Feinberg *et al.*, 2007). Durante experimentos de laboratorio realizados en varios cruceros oceanográficos, solo en pocas ocasiones se observó que hembras ovígeras de *N. simplex* hallan mudado, causando la muerte de los embriones del saco ovígero por falta de movimiento (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2005).

A pesar de que en el presente estudio no se pudieron definir subestadios de la muda con el detalle detectado en camarones peneidos (Promwikorn *et al.*, 2004, 2005), fue evidente que las hembras ovígeras se encontraron típicamente en periodo de intermuda (reposo), ya sea endureciendo el caparazón durante las primeras divisiones de los embriones (1C-blástula) y con gónada en multiplicación (GI) ó en un periodo de inactividad del proceso de muda durante el resto de desarrollo de los embriones dentro del saco ovígero (blástula-MN) con gónada en previtelogénesis (GII) o en vitelogénesis (GIII). Cuando los metanauplios dejan el saco ovígero, la hembra inicia rápidamente el proceso de premuda. En menos de 2 días después de la liberación se ha observado que las hembras mudan. Posteriormente, cerca del 22% de la hembras en la población maduran la gónada (GIV) y puede volver a desovar. Si las condiciones no son adecuadas, las hembras tienen la capacidad de reabsorber la gónada en menos de cuatro días (Gómez-Gutiérrez & Robinson, 2005; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010b). Cada hembra tiene una fase de descanso altamente variable, pero una vez que liberan los embriones, las

hembras pueden desarrollar la gónada de ovogénesis temprana a vitelogénesis en menos de tres días a 16 °C (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010b).

En resumen, esta tesis provee una descripción detallada de la embriogénesis, organogénesis y porcentaje de lípidos y carbohidratos de *N. simplex*, la especie más abundante del Noroeste de México con reproducción de saco ovífero. La semejanza de la división celular y linaje celular en etapas tempranas de la embriogénesis y su apariencia externa con especies de desove externo indican una coherencia filogenética entre especies de distinta estrategia reproductiva en la familia Euphausidae y probablemente en el Orden Euphausicaea. Se demostró que los embriones y larvas dentro del saco ovífero no mudan sino que se transforman en distintos estadios (metamorfosis) sin evidencia de que existan exuvias en el saco ovífero. Además se provee evidencia de que durante el desarrollo embrionario, los lípidos van disminuyendo su área de concentración hasta que el metanauplio retiene cerca del 40% de los lípidos al momento de dejar el saco ovífero. Desde un punto de vista ecológico, esta disminución de lípidos sugiere una susceptibilidad y riesgo considerable para las larvas calítopis 1, debido a que si no se alimentan en 48 h aproximadamente, es probable que exista una condición de inanición irreversible que finalizará en la muerte del individuo. La abundancia de *N. simplex* es elevada cerca de la costa y aparentemente en condiciones naturales es poco probable que las larvas experimenten periodos de inanición prolongada, posiblemente excepto en periodos de intrusión de aguas anómalamente cálidas como los detectados durante El Niño (Lavaniegos *et al.*, 1989).

Hasta ahora no se tenía evidencia observacional si el desarrollo embrionario de los eufáusidos con estrategia en saco ovífero era semejante o distinto al

desarrollo embrionario de especies con estrategia de desove externo. El presente estudio demuestra que la fase embrionaria de *N. simplex*, y probablemente del resto de las especies con desove en saco ovígero, es similar a la de especies de desove externo estudiadas anteriormente. Esto indica una estrecha relación filogenética en la familia Euphausidae. A pesar de que en la presente tesis no se utilizaron marcadores fluorescentes utilizados para realizar mapas celulares y estudiar el linaje de células se pudo evidenciar que *N. simplex* tiene características en su desarrollo embrionario y larvario detectadas en otras especies de eufáusidos, principalmente *M. norvegica* y *E. superba*.

Este estudio es el primero en describir histológicamente el desarrollo embrionario y larvario asociado al proceso de ovogénesis y ciclo de muda de una especie de eufáusido con estrategia reproductiva en saco ovígero. La ventaja de esta estrategia de reproducción es que permite sincronizar y maximizar en términos energéticos y adaptativos los tres procesos, los cuales pueden ser estudiados simultáneamente, cosa que no es fácil de estudiar en especies con desove externo.

*N. simplex* es el eufáusido con mayor abundancia en el Golfo de California y es una especie esencial en la trama alimenticia de múltiples especies. Este estudio junto con otros realizados acerca de la abundancia y distribución y tasas de producción de biomasa de la especie, pueden proveer bases teóricas y biológicas para la conservación de esta especie y la de sus depredadores en el noroeste de México.

## CONCLUSIONES

- 1) Los análisis histológicos demostraron que *N. simplex* tiene un patrón de división celular temprana holoblástica semejante al de los eufáusidos con estrategia de desove externo.
- 2) La diferenciación celular inicia en el estadio de desarrollo temprano de apéndices. La formación de músculos, primordios del intestino y glándula digestiva (hepatopancreas) inicia en el estadio nauplio. El intestino y la glándula digestiva son funcionales en el estadio caliotopis 1 con el inicio de la primera alimentación exógena. Las caliotopis 2 tienen indicios de segmentación exterior (a partir de las líneas de células germinales) pero la segmentación abdominal se completa hasta la caliotopis 3.
- 3) El contenido de carbohidratos en los embriones hasta MN disminuye más rápido que el de lípidos, con un punto de no retorno (PNR) estimado de 48 h para carbohidratos y 96 h para lípidos.
- 4) No existe evidencia (exuvias descartadas) de que los embriones y larvas de *N. simplex* muden dentro del saco ovífero.
- 5) Existe una asociación temporal del desarrollo embrionario y larvario en el saco ovífero con el desarrollo gonádico (multiplicación a previtelogenesis) y con el proceso de muda (intermuda). Cuando los embriones dejan el saco ovífero la hembra entra en fase de premuda, realiza su ecdisis y posteriormente la gónada madura para desovar nuevamente.

## SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO

Se recomienda realizar estudios y observaciones de embriones y larvas de *Nyctiphanes simplex* y otras especies de eufáusidos subtropicales y tropicales teñidos con tinción fluorescente y realizar reconstrucciones tridimensionales en modelos de computadora que complementen las observaciones histológicas. También es necesario realizar observaciones en vivo para poder realizar un mapa celular y de linaje de células más preciso, como se ha realizado con varias especies de decápodos Dendrobranchiata (Hertzler & Clark 1992, Hertzler 2005; Biffis *et al.*, 2009).

La similitud de la división temprana de los embriones en *N. simplex* debe ser corroborada en otras especies de eufáusidos con estrategia reproductiva de saco ovífero. Sin embargo, como estas especies son relativamente poco abundantes (especies del género *Stylocheiron*, *Nematoscelis*, *Pseudeuphausia*) se sugiere realizarse con la especie *Nematoscelis difficilis* por que su tamaño de puesta es elevado (> 400 huevos por hembra) y por que es la segunda (invierno-primavera) o tercera (verano-otoño) especie más abundante en el Golfo de California. Esta especie ha sido mantenida por cortos periodos de incubación en Oregon para detección de desarrollo embrionario y mecanismo de eclosión (Gómez-Gutiérrez, 2003).

Caracterizar el desarrollo embrionario de especies de eufáusidos tropicales y subtropicales, históricamente menos estudiadas, que aunque no sean de importancia comercial pueden ampliar el conocimiento biológico de los eufáusidos

(filogenia, morfología comparada, evolución) en sus fases embrionarias, larvarias, juvenil y los procesos de ovogénesis y muda de los adultos.

Se recomienda realizar fotografías con microscopía electrónica para poder detallar las características externas de embriones (una vez que se rompa el corion) o de las larvas liberadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alwes, F. & G. Scholtz. 2004. Cleavage and gastrulation of the euphausiacean *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea, Malacostraca). *Zoomorphology*, 123: 125–137.
- Amsler, M. & R. Y. George. 1985. Changes in the biochemical composition of *E. superba* Dana embryos during early development. *Polar Biol.*, 4: 61-63.
- Arroyo-Ramírez, K., J. Gómez-Gutiérrez & C. J. Robinson. 2005. *The unseen fishery potential of the subtropical euphausiids from México*. Symposium on Fishery Sciences in México, La Paz, Baja California Sur, México. pp. 92.
- Baker, A., P. Boden & E. Brinton. 1990. *A practical guide to the euphausiids of the world*. Natural History Museum Publications. London, pp. 96.
- Biesiot, B. & H. Perry. 1995. Biochemical composition of the deep sea red crab *Chaceon quinquegens* (geryonidae): organic reserves of developing embryos and adults. *Mar. Biol.*, 124: 407-416.
- Biffis, C., F. Alwes & G. Scholtz. 2009. Cleavage and gastrulation of the dendrobranchiate shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda). *Arthropod Struct. Dev.*, 38: 527–540.
- Bliss, D. 1985. *The Biology of crustacean. Economic aspects: fisheries and culture*. Academic press, Inc. E.U.A., pp. 331.
- Boden, B. 1951. The egg and larval stages of *Nyctiphanes simplex*, a euphausiid crustacean from California. *Proc. Zool. Soc. London*, 121(3): 515–527.
- Botsford, L. 1991. Crustacean egg production and fisheries management. En: Wenner, A. y Kuris, A. (eds). *Crustacean egg production*. Balkena, Rotterdam, Vol. 7, pp. 379-394.

- Brinton, E. 1962. The distribution of Pacific euphausiids. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, 8: 51-270.
- Brinton, E. & A. Townsend. 1980. Euphausiids in the Gulf of California - The 1957 Cruises. *Calif. Coop Oceanic Fish. Invest. Rep.* 21: 211-236.
- Brinton, E., A. Fleminger & D. Siegel-Causei. 1986. The temperate and tropical planktonic biotas of the Gulf of California. *Calif. Coop Oceanic Fish. Invest. Rep.* 27: 228-266.
- Brinton, E., M. Ohman, A. Townsend, M. Knight & A. Bridgeman. 2000. *Euphausiids of the world ocean, Series: World Biodiversity Database CD-ROM Series Windows, Version 1.0. Expert Center for taxonomic identification. Amsterdam, Netherlands.*
- Brodeur, R. & O. Yamamura. (eds) 2005. *Micronekton of the North Pacific*. PICES Science Report No. 30. 115 pp.
- Browne, W. E., A. L. Price, M. Gerberding & N. H. Patel. 2005. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parthysale hawaiiensis*. *Genesis*, 42: 124-149.
- Buchholz, F. 1982. Drach's molt staging system adapted for euphausiids. *Mar. Biol.*, 66: 301-305.
- Buchholz, F. 1991. Moulting cycle and growth of Antarctic krill *Euphausia superba* in the laboratory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 69: 217-229.
- Buchholz, F., J. L. Watkins, J. Priddle, D. J. Morris & C. Ricketts. 1996. Moulting in relation to some aspects of reproduction and growth in swarms of Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Mar. Biol.*, 127: 201-208.

- Buchholz, C. M., F. Buchholz & G. A. Tarling. 2006. On the timing of moulting processes in reproductively active Northern krill *Meganyctiphanes norvegica*. *Mar. Biol.*, 149: 1443-1452.
- Coutteau, P., I. Geurden, M. Cámara, P. Bergot & P. Sorgellos. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155: 149-164.
- Cuzin-Roudy, J. 1993. Reproductive strategies of the Mediterranean krill, *Meganyctiphanes norvegica* and Antarctic krill, *Euphausia superba* (Crustacea: Euphausiacea). *Inv. Rep. Dev.*, 23(2): 105-104.
- Cuzin-Roudy, J. 2000. Seasonal reproduction, multiple spawning, and fecundity in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, and Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57: 6-15.
- Cuzin-Roudy, J., E. Albessard, P. Virtue & P. Mayzaud. 1999. The scheduling of spawning with the moult cycle in Northern krill (Crustacea: Euphausiacea): a strategy for allocating lipids to reproduction. *Inv. Rep. Dev.*, 36(1-3): 163-170.
- Dalpadado, P. & T. Ikeda. 1989. Some observations on moulting, growth and maturation of krill (*Thysanoessa inermis*) from the Barents Sea. *J. Plankton Res.*, 11 (1): 133-139.
- Everson, I. (editor). 2000. Krill biology, ecology and fisheries. Blackwell Science Oxford. 372 pp.
- Feinberg, L. R., C. T. Shaw & W. T. Peterson. 2007. Long-term laboratory observations of *Euphausia pacifica* fecundity: a comparison of two geographic regions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 341: 141-152.

- Fowler, S. W., L. F. Small & S. Keokes. 1971. Effects of temperature and size on molting of euphausiid crustaceans. *Mar. Biol.*, 11: 45-51.
- García-Guerrero, M. 2009. Proximate biochemical variations in eggs of the prawn *Macrobranchium americanum* (Bate, 1869) during its embryonic development. *Aquac. Res.*, 40: 575-581.
- García-Guerrero, M., M. E. Hendrickx & H. Villareal. 2003. Description of the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae), based on the staging method. *Crustaceana*, 76 (3): 269-280.
- García-Guerrero, M. & M. E. Hendrickx. 2006a. Embryology of decapod crustaceans, II: Gross embryonic development of *Petrolisthes robsonae* Glassell, 1945 and *Petrolisthes armatus* (Gibbes, 1850) (Decapoda, Anomura, Porcellanidae). *Crustaceana*, 78 (9): 1089-1097.
- García-Guerrero, M. & M. E. Hendrickx. 2006b. Embryology of decapod crustaceans III: Embryonic development of *Eurypanopeus canalensis* Abele & Kim, 1989, and *Panopeus chilensis* H. Milne Edwards & Lucas, 1844 (Decapod, Brachyura, Panopeidae). *Belg. J. Zool.*, 136 (2): 249-253.
- Gendron, D. 1992. Population structure of daytime surface swarms of *Nyctiphanes simplex* (Crustacea: Euphausiacea) in the Gulf of California, México. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 87: 1-6.
- George, R. Y. 1984. Ontogenic adaptations in growth and respiration of *Euphausia superba* in relation to temperature and pressure. *J. Crust. Biol.*, 4: 255-262.
- George, R. Y. & J. O. Strömberg. 1985. Development of eggs of Antarctic krill *Euphausia superba* in relation to pressure. *Polar Biol.*, 4: 125-133.

- Gómez-Gutiérrez, J. 1992. *Efecto de las condiciones ambientales sobre la distribución y abundancia de las poblaciones de Eufáusidos (Crustácea) en la costa Occidental de Baja California, durante mayo de 1986, julio de 1987 y 1988*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, pp. 144.
- Gómez-Gutiérrez, J. 2002. Hatching mechanism and delayed hatching of the eggs of three broadcast euphausiid species under laboratory conditions. *J. Plankton Res.*, 24: 1265–1276.
- Gómez-Gutiérrez, J. 2003. Hatching mechanism and accelerated hatching of the eggs of a sac-spawning euphausiid *Nematoscelis difficilis*. *J. Plankton Res.*, 25: 1397–1411.
- Gómez-Gutiérrez, J. 2006. Hatching mechanisms and death of euphausiid embryos during hatching: evidences for evolutionary reversal of the free-living nauplius? *Océanides*, 21(1, 2): 63–79.
- Gómez-Gutiérrez, J. & C. J. Robinson. 2005. Embryonic early larval development time, hatching mechanism and interbrood period of the sac-spawning euphausiid *Nyctiphanes simplex* Hansen. *J. Plankton Res.*, 27: 279-295.
- Gómez- Gutiérrez, J. & J. Robinson. 2006. Tidal current transport of epibentic swarms of the euphausiid *Nyctiphanes simplex* in a shallow subtropical bay in Baja California Sur México. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 320: 215-231.
- Gómez-Gutiérrez, J., N. Tremblay, S. Martínez-Gómez, C. J. Robinson, J. Del Ángel-Rodríguez, C. Rodríguez-Jaramillo & C. Zavala-Hernández. 2010 a. Biology of the subtropical sac-spawning euphausiid *Nyctiphanes simplex* in the northwestern seas of Mexico: Vertical and horizontal distribution patterns and seasonal variability of brood size. *Deep-Sea Res. II*, 57(7-8): 606-615.

- Gómez-Gutiérrez, J., C. Rodríguez-Jaramillo, J. Del Ángel-Rodríguez, C. J. Robinson, C. Zavala-Hernández, N. Tremblay & S. Martínez-Gómez. 2010 b. Biology of the subtropical sac-spawning euphausiid *Nyctiphanes simplex* in the northwestern seas of Mexico: Interbrood period, gonad development and lipid content. *Deep-Sea Res., II*, 57(7-8): 616-630.
- Gómez-Gutiérrez, J. W. T. Peterson & C. B. Miller. 2010 c. Embryo biometry of three broadcast spawning euphausiid species applied to identify cross-shelf and seasonal spawning patterns along the Oregon coast. *J. Plankton Res.*, 32(6): 739-760.
- Hempel, G. 1985. Antarctic marine food webs. En: Siegfried, W., P. Condy & R. Laws (eds). *Antarctic nutrients cycles and food webs*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 266-270.
- Hertzler, P. L. 2002. Development of the mesendoderm in the dendrobranchiate shrimp *Sicyonia ingentes*. *Arthrop. Struct. & Develop.*, 31: 33–49.
- Hertzler, P. L. 2005. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Penaeus (Liptopenaeus) vannamei* (Malacostraca, Decapoda, Dendrobranchiata). *Arthrop. Struct. & Develop.*, 34: 455–469.
- Hertzler, P. L. & W. H. Clark. 1992. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: invagination is accompanied by oriented cell division. *Development*, 116: 127-140.
- Hertzler, P. L., S. W. Wang & W. H. Clark. 1994. Mesendoderm cell and archenteron formation in isolated blastomeres from the shrimp *Sicyonia ingentis*. *Develop. Biol.*, 164: 333-344.

- Holland, D. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates, 85-123. En: Malins, D. C., (ed). *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, Seattle.
- Hosie, G.W. & D.A. Ritz. 1989. Body shrinkage in the sub-tropical euphausiid *Nyctiphanes australis* G.O. Sars. *J. Plankton Res.*, 11(3): 595-598.
- Ikeda, T. 1984a. Development of the larvae of the Antarctic krill (*E. superba* Dana) observed in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 75: 107-117.
- Ikeda, T. 1984b. Sequences in metabolic rates and elemental composition (C, N, P) during the development of *Euphausia superba* Dana, and estimated food requirement during its life span. *J. Crustacean Biol.*, 4: 273-284.
- Ju, S.-J., H. R. Harvey, J. Gómez-Gutiérrez & W. T. Peterson. 2006. The role of lipids during embryonic development of the euphausiids *Euphausia pacifica* and *Thysanoessa spinifera*. *Limnol. Oceanogr.*, 51(5):2398-2408.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137- 138.
- Lavaniegos-Espejo, B. 1996. Vertical distribution of euphausiid stages in waters adjacent to Baja California. *Fish. Bull.*, 94(2): 300-312.
- Lavaniegos-Espejo, B., J. R. Lara-Lara & E. Brinton. 1989. Effects of the 1982-83 El Niño event on the euphausiid populations of the Gulf of California. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.*, 30: 73-87.
- Maas, A. & D. Waloszek. 2001. Larval development of *Euphausia superba* Dana, 1852 and a phylogenetic analysis of the Euphausiacea. *Hydrobiologia*, 448: 143-169.

- Manton, S. M. 1928. On the embryology of a musid crustacean *Hemimysis lamornae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 216:363-463.
- Martínez-Gómez, S. 2009. *Producción de biomasa del eufáusido Nyctiphanes simplex (Crustácea: Euphausiacea) en el Golfo de California, B.C.S., México*. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B.C.S. pp. 94
- Mauchline, J. & L. Fisher. 1969. The biology of the euphausiids. En: Russell, F., & M. Young (eds), *Advances in Marine Biology*, Academic Press, London, 7: 1-454.
- Muller Y., E. Nazari & M. Simoes-Costa. 2003. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olofersii* (Decapoda Palaemonidae). *J. Crustacean Biol.*, 23: 869-875.
- Musgrove, R. J. 2000. Molt staging in the southern rock lobster *Jasus edwardsii*. *J. Crustacean Biol.*, 20: 44-53.
- Nagao, J., H. Munehara & K. Shimazaki. 1999. Embryonic development of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*. *J. Crustacean Biol.*, 19: 77-83.
- Nakatsuji, T. & H. Sonobe. 2004. Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 135: 358-364.
- Nazari, E., Y. Rauh & D. Ammar. 2000. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 73: 143-152.
- Nemoto, T., K. Kamada & K. Hara. 1972. Fecundity of an euphausiid crustacean, *Nematoscelis difficilis*, in the North Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, 14: 41-47.

- Nicol, S. 1989. Apparent independence of the spawning and moulting cycles in female antarctic krill (*Euphausia superba* Dana). *Polar Biol.*, 9: 371-375.
- Nicol, S. 2000. Understanding krill growth and aging: the contribution of experimental studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57: 168-177.
- Nicol, S. 2003. Living krill, zooplankton and experimental investigations: a discourse on the role of krill and their experimental study in marine ecology. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, 36(4): 191-205.
- Nicol, S. & Y. Endo. 1999. Krill fisheries: development, management and ecosystem implications. *Aquat. Living Resour.*, 12(2): 105-120.
- Nicol, S., W. De La Mare & M. Stolp. 1995. The energetic cost of egg production in the Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana). *Antartct. Sci.*, 7 (1): 25-30.
- Pillar, S., V. Stuart, M. Barange & M. Gibbons. 1992. Community structure and trophic ecology of euphausiids in the Benguela Ecosystem. En: Payne, A., I. Brink, K. Mann & R. Hilborn (eds). Benguela Trophic Functioning. *South African J. Mar. Sc.*, 12: 393-409.
- Poleck, T. P. & C. J. Denys. 1982. Effect of temperature on the molting, growth and maturation of the Antarctic krill *Euphausia superba* (Crustacea: Euphausiacea) under laboratory conditions. *Mar. Biol.*, 70: 255-265.
- Ponomareva, L. A. 1963. *Euphausiids of the North Pacific. Their distribution and ecology*. Academy of Sciences in the USSR Institute of Oceanology. Translated from Russian. US Department of the interior and the National Science Foundation, pp. 1-154.

- Promwikorn, W., P. Kirirat & P. Thaweethamseewee. 2004. Index of molting cycle in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci.Tech.*, 26: 765-772.
- Promwikorn, W., P. Boonyoung & P. Kirirat. 2005. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci.Tech.*, 27: 499-509.
- Quetin, L. B. & R. M. Ross. 1984. Depth distribution of developing *Euphausia superba* embryos, predicted from egg sinking rates. *Mar. Biol.*, 78:47-53.
- Quetin, L. B. & R.M. Ross. 1989. Effects of oxygen, temperature and age on the metabolic rate of the embryos and early larval stage of the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 125: 43-62.
- Rodríguez-Moscoso, E. & R. Arnaiz. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of grooved carpet-shell clam, *Tapes decussurus* (Linneuss, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture*, 162:125-139.
- Ross, M., K. Daly & S. English. 1982. Reproductive cycle and fecundity of *Euphausia pacifica* in Pudget Sound Washington. *Limnol. Oceanog.*, 27(2): 304- 314.
- Ross, R. M. & L. B. Quetin. 1989. Energetic cost to develop to the first feeding stage of *Euphausia superba* Dana and the effect of delays in food availability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 133: 103-127.
- Ross, M. & L. Quetin. 2000. Reproduction in Euphausiacea. En: Everson, I. (ed). *Krill biology, ecology and fisheries. Fisheries and aquatic resources series*. Blackwell Science. Cornwall, pp. 150-181.
- Sargent, J., L. Mc Evoy, A. Estevez, M. Bell, J. Henderson & D. Tocher. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development. *Aquaculture*, 179: 217-229.
- Sars, G. O. 1898. On the propagation and early development of Euphausiidae. *Arch. Math. Naturv.*, 20: 1-41.

- Sasaki, J. & Y. Mihara. 1993. Early larval stages of the hair crab *Erimacrus isenbeckii* (Brandt) (Brachyura: Atelecyclidae), with special reference to its hatching process. *J. Crustacean Biol.*, 13: 511-522.
- Scholtz, G. 2000. Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 38:175-187.
- Scholtz, G. & W. Dohle. 1996. Cell lineage and cell fate in crustacean embryos- a comparative approach. *Int. J. Dev. Biol.*, 40: 211-220.
- Schram, F. 1986. *Crustacea*. Oxford University press. Nueva York, pp. 606.
- Sheehan, D & B. Hrapchak. 1980. *Theory and practice of Histotechnology, 2nd Ed.* Battelle Press, Ohio. Pp. 330-331.
- Skinner, D. M. 1985. Interacting factors in the control of the crustacean molt cycle. *Amer. Zool.*, 25: 275-284.
- Stuart, V. 1992. Fecundity of *Euphausia lucens* (Hansen). Laboratory evidence of multiple broods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 160: 221-228.
- Tarling, G.A. & J. Cuzin-Roudy. 2003. Synchronization in the molting and spawning activity of northern krill (*Meganyctiphanes norvegica*) and its effect on recruitment. *Limnol. Oceanogr.*, 48(5): 2020–2033.
- Taube, E. 1909. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Euphausiden. I Die Furchung des Eis bis zur Gastrulation. *Z. Wiss. Zool.*, 92: 427-464.
- Taube, E. 1915. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Euphausiden. II Von der Gastrulation bis zum Furciliastadium. *Z. Wiss. Zool.*, 94, 577-658.
- Timofeev, S.F. & V. V. Sklyar. 2001. Egg size in the euphausiid *Thysanoessa raschii* M. Sars, 1864) (Euphausiacea) in the Barents Sea. *Crustaceana*, 74(1): 1201–1211.
- Timofeev, S.F., V. V. Sklyar & M. V. Savinov. 2004. Stabilizing selection on egg size

- in the euphausiid, *Thysanoessa raschii* (M. Sars, 1864) (Euphausiacea) in the Barents Sea. *Crustaceana*, 77(3): 267–275
- Tolivia, J., A. Navarro & D. Tolivia. 1994. Polychromatic staining OS epoxy semithin sections: a new and simple method. *Histochemistry*, 101:51-55.
- Yano, I. 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.*, 99: 547-553.
- Zavala-Hernández, C. 2007. *Estrategias reproductivas en tres especies de eufáusidos (Crustácea: Euphausiacea) subtropicales en el Golfo de California*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. pp. 87.
- Zelikman, E. 1957. On gonad maturation and female productivity in species of euphausians abundant in the Barents Sea. *Dolk. Akod. Nauk. Sssr. Biol. Sci. Transt. Ser.*, 118: 118-121.
- Zilch, R. 1978. Embryologische Untersuchungen an der holoblastischen Ontogenese von *Penaeus trisulcatus* Leach (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphologie*, 90: 67-100.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

- 1.- Hidratar en agua destilada.
- 2.- Mordentar en Bouin durante 1 h a 58°C o a temperatura ambiente toda una noche.
- 3.- Dejar enfriar, lavar en agua corriente hasta quitar el color amarillo (10 min.)
- 4.- Teñir con Hematoxilina de Weigert (de hierro) durante 10 min.
- 5.-Lavar en agua corriente 10 minutos
- 6.- Enjuagar en agua destilada
- 7.-Teñir con Escarlata de Biebrich-fucsina ácida 7 a 10 min.
- 8.-Lavar en agua destilada (1-2 min)
- 9.-Solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico de 10 a 15 min.
- 10.- Teñir con Anilina Azul o light green 5 min.
- 11.- Agua destilada un baño
- 12a.-Si se usa anilina azulosa diferenciar con ácido acético al 1% un minuto (o 3 a 5, depende del colorante).
- 12b. Si se usa verde (light green) diferenciar con solución de ácido fosfotungstico por 15 min.
- 13.- Deshidratar en alcohol al 96 % por 1 min.
- 14.-Deshidratar en alcohol al 100 % I y II 2 min. c/u
- 15.- Aclarar en Xilol o Citrosolv I, II y III 5 min. c/u y montar en resina tipo metacrilato.

## **ANEXO 2**

### **TINCIÓN PAS**

- 1.- Hidratar los cortes hasta agua destilada.
- 2.- Teñir con azul alciano, durante 15 min.
- 3.- Lavar en agua destilada durante 2 minutos.
- 4.- Pasar los cortes a ácido peryódico al 0.5%, durante 10 minutos.
- 5.- Lavar en agua corriente durante 5 minutos y enjuagar con agua destilada.
- 6.- Pasar los cortes por el reactivo de Schiff, durante 10 a 15 minutos en el refrigerador.
- 7.- Pasar los cortes a la solución sulfurosa, haciendo tres cambios, de dos minutos cada uno.
- 8.- Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
- 9.- Teñir con Hematoxilina Férrica de Weigert, por 5 minutos o bien usando la HE normal.
- 10.-Lavar con agua destilada por 2 minutos.
- 11.-Deshidratar a partir de alcohol de 96 I y alcohol etílico absoluto I y II por 5 minutos en cada uno.
- 12.-Aclarar en citrisol durante 5 minutos.
- 13.-Montar con resina sintética o entellan.

## **ANEXO 3**

### **PROTOCOLO DE TRABAJO PARA PROCESO HISTOLÓGICO PARA MUESTRAS EN HISTORESINA (para cortes finos)**

#### **FIJACIÓN DE LOS ORGANISMOS EN SOLUCIÓN KARNOVSKY**

- 1.- Fijar con la solución Karnovsky durante 24 a 48 h (Karnovsky, 1965).
- 2.- Pasar al medio de lavado 2 baños de 30 min c/u.
- 3.- Iniciar la deshidratación en alcohol 30% (pueden dejarse ahí durante varios días en refrigeración).
- 4.- Continuar deshidratando en alcohol 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 96% y 100%, 1 hora c/u.
- 5.- Infiltrar en resina según recomendaciones del fabricante.

#### **INCLUSIÓN**

##### **Solución de inclusión:**

25 mL de solución infiltradora (líquido base y activador) y 0.5 mL de endurecedor, se mezclan muy bien a una temperatura de 4° C. Después de eso, el tejido que va a ser incluido es inmerso y la solución se agita por 5 min. La solución de inclusión perfectamente mezclada se vierte en el molde de inclusión y el tejido se pone en la posición deseada. Inmediatamente después de esto, se coloca el soporte sobre el molde y se coloca en un recipiente cerrado herméticamente sobre hielo molido a 4° C o en el refrigerador durante 12 a 24 h. Los cortes semifinos( 0.5 a 1µm) se realizaron en un micrótopo de rotación (Leica RM 2155) con navaja de carburo de tungsteno (Leica TC65) y teñidos con tinción policrómica (Tolivia et al. 1994).

## **ANEXO 4**

### **MÉTODO DE SUDAN NEGRO PARA GRASAS.**

- 1.-Colocar los cortes en alcohol al 70%.
- 2.-Teñirlos por 15 minutos en la solución de Sudán Negro. Filtrarla antes de usar.
- 3.-Diferenciar en alcohol al 70%.
- 4.-Contrastar los núcleos con Carmalum o rojo rápido nuclear o hematoxilina de Harris.
- 5.-Lavar bien en agua corriente.
- 6.-Lavar en agua destilada.
- 7.-Montar en gelatina glicerinada.