

Reproducción y desarrollo de *Ecteinascidia turbinata* (Ascideacea: Perophoridae) en Cuba

Aida Hernández-Zanuy, Alida García-Cagide, Macario Esquivel y Alina Blanco

Instituto de Oceanología del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de Cuba. Ave. 1era y 186 No. 18406, Playa, La Habana, Cuba.

Fax: (537) 33-9112. E-mail: aidah@oceano.inf.cu

Recibido 4-III-1999. Corregido 3-XI-1999. Aceptado 19-XI-1999.

Abstract: The reproduction of *Ecteinascidia turbinata* was studied in Punta del Este, Isla de la Juventud, Cuba. Gonadal development of 4 606 zooids from 30 colonies was studied in six localities by monthly samples from June 1994 through May 1995. In addition, from August to November 1997, the regenerating capacity of the colonies was assessed. Number and diameter of oocytes, embryos and larvae were measured in 21 zooids (17-23 mm long). Five stages of gonad development are described: juvenile, immature, mature, in larval release and in reabsorption. The zooids reach 27 mm in length. Immature zooids may exceed 60 % of the total population throughout the year and prevail in most length classes. Minimum size for mature zooids was 6.7 mm, but more than 50 % of mature and at larval release zooids measured 19-20 mm. Sexual reproduction occurs from September through July with a peak in April-May. Asexual reproduction occurs year-round, but more intensely during the summer, especially in August. After the spawning and reabsorption of all zooids in a colony, the following cycles of generation-degeneration of the colony repeat approximately every 40 days.

Key word: Tunicate, ascidian, reproduction, annual variations.

Ecteinascidia turbinata Herdman 1880 tiene amplia distribución en Cuba y ocupa diversos hábitats. Suele ser abundante en el ecosistema de manglar y en la última década ha alcanzado un lugar destacado entre los organismos marinos productores de sustancias biológicamente activas porque de ella se obtienen moléculas complejas, con potente actividad antitumoral, denominadas ecteinascidinas (Rinehart *et al.* 1990).

En particular ha sido comprobada la potencialidad del compuesto "*Ecteinascidina 743*" contra el melanoma y los cánceres de pulmón y mama (Nieves 1995). Hasta el presente la producción del medicamento depende de la recolección de organismos en el medio natural, de ahí la importancia del estudio biológico de la especie como base para su explotación sostenible.

Los estudios realizados sobre la biología de esta especie son escasos. La mayor parte han estado dirigidos al conocimiento de algunos aspectos de la reproducción como origen y desarrollo de las células germinales, época de reproducción, y características del zooide y la larva (Simkins 1924, Berrill 1932, 1935, Young 1986, Young y Bingham 1987, Bingham y Young 1991). Sólo Morgan (1977) realizó observaciones estacionales sobre su crecimiento, edad de maduración y longevidad, en aguas de Puerto Rico, y Carballo *et al.* (1997) estudiaron la distribución, densidad y crecimiento de la población en la Isla de Formentera, España.

En aguas templadas y subtropicales el desove de diferentes especies de ascidias se limita a los meses más cálidos del año (Berrill 1935, Sabbadin 1960, Brunetti 1976), y la

mayoría tiene uno o dos picos de reproducción durante el ciclo anual (Millar 1971, Berril 1975), pudiendo producirse de forma alterna o simultánea la reproducción sexual y asexual (Svane y Young 1989).

En general se consideran como factores reguladores del ciclo reproductivo en las ascidias: la temperatura, el fotoperíodo, las fases de la luna, las mareas y la densidad del fitoplancton (Svane y Young 1989), pero en el caso de *E. turbinata* la influencia de estos factores no ha sido profundamente estudiada.

Sobre la fecundidad y características de las larvas de *Ecteinascidia turbinata* no encontramos mucha información. Se sabe que es ovovivípara (Svane y Young 1989). La fertilización es interna y la incubación se realiza en el espacio peribranchial, produciéndose el desove de las larvas por la mañana y la fijación y metamorfosis ocurre en 24 horas (Morgan 1977). Al parecer, las larvas nadan en espiral durante cuatro o seis horas (Simkins 1924) y su dispersión depende mayormente de la corriente y no de su propia natación (Olsen y McPherson 1987: citado por Svane y Young 1989).

El presente trabajo es parte de las investigaciones que desde 1994 realiza el Instituto de Oceanología sobre la biología, ecología y manejo de las poblaciones naturales de *E. turbinata* en aguas de la plataforma cubana, y tiene como objetivos conocer las características del desarrollo gonadal, la talla de alcance de la madurez sexual, la época de reproducción y la fecundidad de *E. turbinata* en Punta del Este (zona suroeste de la plataforma de Cuba).

MATERIALES Y MÉTODOS

Mensualmente durante un año, de junio 1994 a mayo de 1995 (exceptuando el mes de noviembre debido a una perturbación ciclónica), se observó el desarrollo gonadal en el medio natural y se colectaron cinco zooides de la parte superior, central e inferior de 30 colonias marcadas y distribuidas en seis estaciones (cin-

co colonias en cada estación) en el manglar de Punta del Este (21° 33' N, 82° 32' W), Isla de la Juventud, zona suroeste de Cuba.

Los zooides se preservaron en formaldehído al 4 % con agua de mar, neutralizado con tetraborato de sodio. En total se midieron 4 606 zooides a los cuales se les determinó el grado de desarrollo de las gónadas con un microscopio estereoscópico. El largo de los zooides se midió desde la escotadura entre los dos sifones hasta la unión del pedúnculo y la base de la túnica del zooides (Fig. 1A). A 21 zooides se le contaron y midieron los oocitos, embriones y larvas. El diámetro de los oocitos y huevos fecundados se midió colocando la escala del micrómetro ocular al azar, sin tener en cuenta el mayor o menor diámetro de éstos. Para el tamaño de las larvas se consideró solo el largo de la "cabeza" desde la base donde sale la cola hasta la escotadura que se forma entre las ventosas (Fig. 1B). No se midió la cola porque por lo general están muy dobladas.

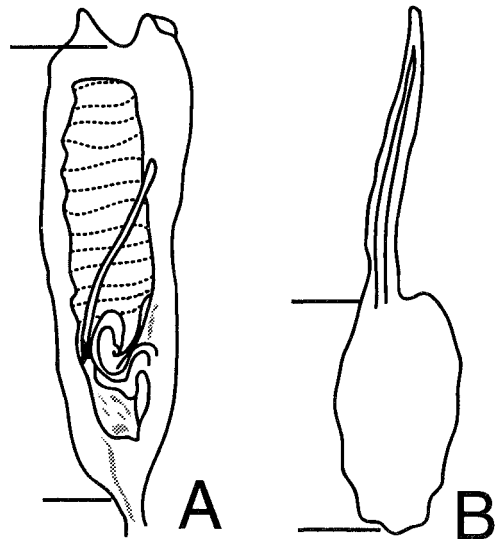


Fig. 1. Forma en que se midió el largo del: (A) zooides y (B) larva.

Fig. 1. Way of measuring the length of: (A) zooid and (B) larva.

La temperatura del agua se midió con un termómetro de superficie en diferentes puntos de cada estación, calculándose el valor promedio mensual para todas las estaciones.

Para conocer si existían diferencias en el desarrollo de los zooides de la parte superior, media e inferior de la colonia realizamos una prueba χ^2 para muestras independientes. Se confeccionó una tabla de contingencia de tres caracteres correspondientes a las tres partes de la colonia donde se extrajeron las muestras, y cuatro niveles correspondientes a las cantidades de zooides en diferentes estadios de desarrollo gonadal: inmaduros, maduros, en liberación larvar y en reabsorción, por meses.

Con el objetivo de profundizar sobre la reproducción asexual de la especie y la duración del ciclo de vida de las colonias, durante los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre de 1997, se realizaron algunos muestreos y observaciones sobre la capacidad de regeneración de las colonias a partir de la red de estolones y el desarrollo gonadal de los zooides. A finales de agosto se marcaron cinco colonias de las cuales durante dos meses y medios, cada tres días, se medía el largo y se anotaba el estadio de desarrollo gonadal de 20 zooides escogidos al azar. Además, semanalmente, durante los cuatro meses se realizaron muestreos al azar en las seis estaciones del área de estudio para conocer el estadio de desarrollo gonadal de las colonias.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta el largo del zooide y la presencia de gónadas, oocitos maduros, embriones y larvas durante el crecimiento y reabsorción del zooide, diferenciamos cinco estadios de desarrollo gonadal:

Juveniles: Zooides hasta 13 mm de largo, el 44 % con 5 - 7 mm. En esta fase no se observan las gónadas. Se consideran juveniles tanto los oozoides producto de la implantación y metamorfosis larval como los blastozooides originados por gemación.

Inmaduros: Zooides de 2 a 26 mm de largo, el 58 % con 9 - 14 mm. En esta fase a simple vista se observa una banda de pequeños puntos blancos o naranja que forman una "C", en la parte inferior derecha del zooide, que es el teste. Al microscopio se puede apreciar que estos puntos tienen forma de lágrima y son las ámpulas que contienen los espermatozooides y rodean a diminutas esferas transparentes, los oocitos, que por lo general no se pueden diferenciar a simple vista en esta etapa de desarrollo.

Maduros: Zooides de 7 a 26 mm, el 65 % con 15 - 19 mm. En esta fase se ven las gónadas con facilidad a simple vista. El teste ha aumentado de tamaño y tiene aspecto de un ramillete de color blanco o naranja, uniéndose los diferentes túbulos que salen de las ámpulas en un espermoducto que se prolonga a lo largo del intestino, en la cavidad atrial del zooide. Los oocitos maduros tienen color naranja y junto a ellos hay otros transparentes, de menor diámetro, inmaduros. En esta fase no ha ocurrido la fecundación, por lo cual no se observan embriones o larvas en el saco peribranchial, en el lado izquierdo del zooide.

En liberación larval: Zooides de 12 a 27 mm de largo (algunos con 30 - 34 mm), el 67 % con 17 - 21 mm. En esta fase se produce la fecundación, la embriogénesis y la liberación de las larvas. A simple vista se pueden ver en la cavidad del saco peribranchial desde la parte inferior hasta cerca del sifón exhalante un cordón de embriones que están en diferentes fases de desarrollo y larvas próximas a ser liberadas. El teste continúa de gran tamaño y en el ovario hay oocitos maduros e inmaduros.

En reabsorción: Zooides de 4 a 24 mm de largo, el 69 % con 12 - 18 mm. Los zooides tienen aspecto flácido, como un saco vacío. Pueden verse restos de embriones y larvas. El teste y el ovario han desaparecido o tienen características semejantes a un zooide inmaduro. En la etapa final de esta fase se encuentran las tunicas vacías pegadas a la red de estolones.

El desarrollo gonadal de los zooides en la parte superior, media e inferior de las colonias fue semejante durante casi todo el año. Para un

nivel de significación de 0.05, sólo en dos de los once meses analizados los valores calculados fueron menores que los esperados.

La distribución por tallas y estadios de desarrollo gonadal de 4 606 zooides (Fig. 2), muestra cómo aumenta el largo medio de los zooides con el desarrollo gonadal, hasta el momento en que comienza la reabsorción y se produce una ligera disminución de la talla. Los zooides alcanzaron hasta 27 mm de largo y el 78 % de ellos estaban inmaduros, mientras que sólo el 18 % estaban maduros y en liberación larval.

Aunque encontramos un zooide maduro con 6.7 mm de largo, la mayoría de los zooides comienzan a madurar a partir de los 14 mm de largo (Fig. 2). El 50 % de los zooides maduros y los que estaban liberando larvas tenían entre 19 y 20 mm.

En nuestras aguas la proporción de zooides en diferentes estadios de desarrollo gonadal durante un ciclo anual (Fig. 3), indica que esta especie se reproduce asexualmente durante todo el año, pero con mayor intensidad durante el verano, y de forma sexual de septiembre a julio, con un máximo en abril-mayo.

Durante casi todo el año más del 60 % de los zooides estaban inmaduros. En los muestreos realizados en agosto de 1994 y 1997 no encontramos ningún zooide maduro, y observamos que aunque las gónadas estaban formadas, y los zooides alcanzaban el tamaño de maduración sexual, éstas no maduraron y las colonias se reabsorbieron sin llegar a reproducirse sexualmente.

En 21 zooides maduros y en liberación larval, con largos entre 17 y 23 mm, el número de oocitos, en diferentes fases de desarrollo, varió entre 4 y 37 (promedio 21 ± 8), los embriones de 1 a 30 (promedio 11 ± 9), y las larvas de cero a cuatro (promedio 3 ± 2). El diámetro fue de hasta 0.7 mm en los oocitos, de 0.6 a 0.9 mm en los embriones y entre 0.9 y 1.4 mm la "cabeza" de la larva.

Aunque en el presente trabajo no fue posible seguir el ciclo de vida de la especie desde el momento de la fijación de la larva, a partir

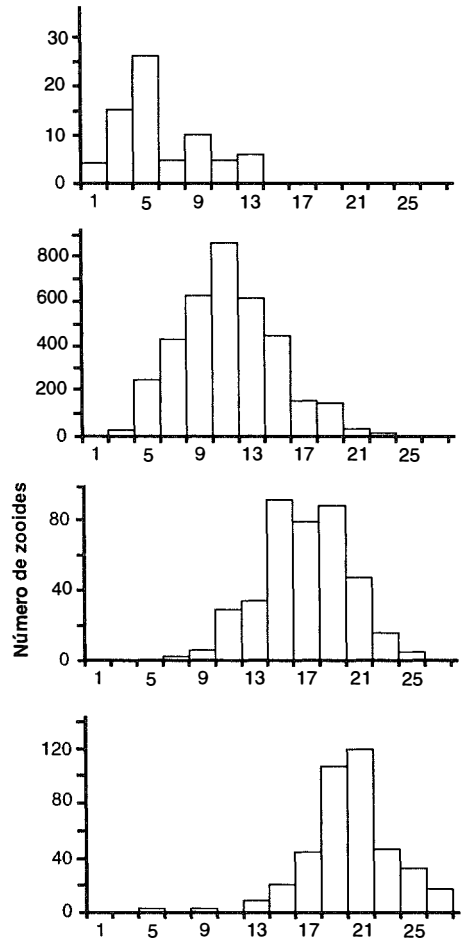


Fig. 2. Distribución por tallas de zooides en diferentes estadios de desarrollo gonadal.

1: juveniles; 2: inmaduros; 3: maduros; 4: en liberación larval; 5: en reabsorción.

Fig. 2. Size distribution of zooids in different stages of gonad development.

1: juvenile; 2: immature; 3: mature; 4: in larval release; 5: in reabsorption.

de una experiencia realizada sobre la regeneración individual de cinco colonias (Cuadro 1), observamos que en éstas, después que se produce la reabsorción de todos los zooides, se origina una nueva generación asexual y la maduración sexual ocurre aproximadamente a los 22 días. Luego, la colonia permanece algo más de dos semanas reproduciéndose sexualmente hasta la siguiente fase de reabsorción total. Es importante destacar que en la colonia No.2,

durante el primer ciclo, en las primeras semanas del mes de septiembre, no se produjo la maduración de los zooides y la colonia se reabsorbió sin llegar a reproducirse

sexualmente. Estos ciclos que podemos denominarlos ciclos de generación-degeneración, se repiten cada 40 días aproximadamente.

CUADRO 1

Ciclo de generación-degeneración en cinco colonias de Ecteinascidia turbinata
Generation-degeneration cycle in five colony of Ecteinascidia turbinata

Duración de la experiencia (días)	Duración de los dos ciclos observados (días)		Inicio de la maduración en cada ciclo (días)		Cantidad de días, en cada ciclo, que las colonias liberaron larvas	
	1er ciclo	2do ciclo	1er ciclo	2do ciclo		
76	47	29	23	18	24	11
76	35	41	0*	30	0	11
73	35	-	22	-	13	-
66	37	-	22	-	15	-
76	40	35	22	19	18	16

* no se produjo la maduración

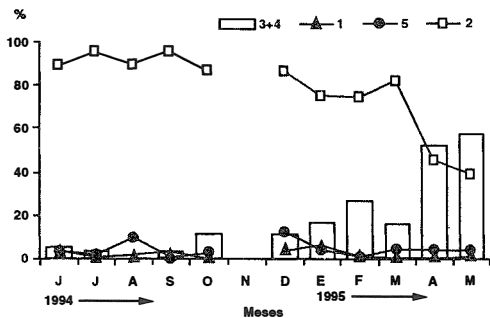


Fig. 3. Variación mensual del porcentaje de zooides en diferentes estadios de desarrollo gonadal.

3+4: maduros y liberando larvas; 1: juveniles; 5: en reabsorción; 2: inmaduros.

Fig. 3. Monthly variation of zooid percentage in different stages of gonad development.

3+4: mature and in larval release; 1: juvenile; 5: in reabsorption; 2: immature.

DISCUSIÓN

Ecteinascidia turbinata, al igual que otras ascidias coloniales (Cloney 1987), se reproduce de forma sexual por gametos y asexual por yemas. La reproducción asexual de las ascidias coloniales puede producirse por gemación o por estrobilación y hay una gran diversidad de modos de gemación (Satoh 1994). En

esta especie observamos que existe una gemación propagativa de tipo estolonial y una gemación de supervivencia. De la base del oo-zoide (zoide originado de la larva) y sobre el sustrato, comienza a crecer un estolón del cual emergen perpendiculares pequeñas yemas que dan lugar a nuevos zooides (los blastozooides). Después que los blastozooides maduran y expulsan todas las larvas, degeneran dejando una red de estolones con yemas de supervivencia sobre el sustrato.

En la literatura revisada no encontramos ninguna referencia donde se describan los estadios de desarrollo gonadal de *Ecteinascidia turbinata*. Nosotros por razones de índole práctica, consideramos cinco estadios basados en los caracteres macroscópicos que nos permitieran diferenciar el grado de desarrollo de las colonias en el medio natural.

Sobre la talla de inicio de la maduración en esta especie, sólo Simkins (1924) dice que hay oogonias de 17µm de diámetro en zooides de 3.6 mm y huevos de 700 – 750 µm en zooides de 10 mm a los 21 días de vida sésil. Por su parte, Morgan (1977) analizó el comienzo de la maduración sexual con relación al tamaño y edad de la colonia y no al de los zooides,

y consideró que las colonias maduran por primera vez, como promedio, a los 62 días de ocurrida la metamorfosis de la larva. Nuestros datos muestran que *Ecteinascidia turbinata* comienza a madurar a partir de los 6 mm de largo pero el 50 % de los zooides maduros y los que están liberando larvas tienen entre 19 y 20 mm de largo.

En Bermuda al igual que en la isla de Formentera, *Ecteinascidia turbinata* se reproduce simultáneamente de forma sexual y asexual durante los meses de verano (Simkins 1924, Berril 1932, Carballo *et al.* 1997). En aguas de Puerto Rico ocurren los dos tipos de reproducción de forma simultánea durante todo el año, con un incremento de la fijación de las larvas en la época de lluvia, de septiembre a diciembre (Morgan 1977). En nuestras aguas también ocurren los dos tipos de reproducción de forma simultánea pero con predominio de la reproducción asexual en los meses de julio y agosto y la sexual en abril y mayo.

Probablemente debido a las altas temperaturas del agua en el mes de agosto las colonias no se reproducen sexualmente. Morgan (1977) no observó este fenómeno en La Parguera, Puerto Rico, donde la temperatura promedio en agosto alcanzó en los dos años de muestreo 29.2 y 28.7 °C respectivamente. En Punta del Este, los valores extremos de la temperatura promedio en aguas superficiales fueron 23.4 °C en el mes de enero de 1995, y 30.6 °C en agosto de 1994, siendo el valor más alto observado 34 °C. Por otra parte, en la Isla de Formentera cuando la temperatura es menor de 22 °C la población desaparece, quedando la red de estolones (Carballo *et al.* 1997). Al parecer la reproducción sexual en *Ecteinascidia turbinata* se produce entre valores de temperatura del agua de 22 °C a 29.5 °C.

En relación a la fecundidad de esta especie consideramos que es necesario procesar un mayor número de muestras para definir con mayor exactitud su potencial reproductivo. Morgan (1977) plantea que contó hasta 48 embriones en un zooides, y en condiciones de laboratorio observó que se expulsaban hasta 10

larvas en un día, pero no dice la cantidad de días que desova cada zooides.

Los resultados obtenidos en relación con la duración de los ciclos de generación-degeneración de las colonias en la experiencia realizada, fueron semejantes a los obtenidos por Morgan (1977) en aguas de Puerto Rico. Según dicho autor, durante la etapa en que la colonia se reproduce sexualmente, mientras que los zooides más viejos se reabsorben después de expulsar sus larvas, otros zooides continúan creciendo y pasadas algunas semanas todos los zooides, incluyendo los más jóvenes, mueren abruptamente. En la experiencia realizada por Morgan (1997), las colonias vivieron un poco más de un año y durante este tiempo se produjeron de seis a ocho generaciones asexuales subsecuentes. Estas generaciones maduraron aproximadamente a los 18 días y vivieron alrededor de 45 días, observándose una disminución paulatina del tamaño de la colonia en el tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la valiosa cooperación prestada por la Delegación del CITMA en la Isla de la Juventud, y en especial a los trabajadores del Radar de Punta del Este y la tripulación de las embarcaciones Tingo y Kamaraco

RESUMEN

Se presentan algunas características de la reproducción de *Ecteinascidia turbinata* en Punta del Este región suroeste de Cuba. Para conocer el desarrollo gonadal de la especie, se analizaron 4 606 zooides provenientes de 30 colonias, distribuidas en seis estaciones, que se muestrearon mensualmente de junio de 1994 a mayo de 1995. De agosto a noviembre de 1997 se realizaron algunos muestreos para determinar la capacidad de regeneración de las colonias. Se establecieron cinco estadios de desarrollo gonadal: Juveniles, Inmaduros, Maduros, en Liberación larval y en Reabsorción. Los zooides alcanzan hasta 27 mm de largo. La talla mínima de maduración sexual de los zooides fue de 6.7 mm, pero más del 50 % de los maduros y en fase de liberación de larvas tienen entre 19 y 20 mm de largo. Los zooides inmaduros predominan en la mayoría de las clases de largo y constituyen más del 60 % del

total durante casi todo el año. *E. turbinata* se reproduce de forma sexual de septiembre a julio, con un máximo en abril-mayo y asexualmente durante todo el año, aunque con mayor intensidad durante el verano y principalmente en el mes de agosto. En 21 zooides con largos entre 17 y 23 mm, se contaron y midieron los oocitos, embriones y larvas. Después de producido el desove y la reabsorción de todos los zooides de una colonia, los siguientes ciclos de generación-degeneración de la colonia se repiten aproximadamente cada 40 días.

REFERENCIAS

- Berril, N.J. 1932. The mosaic development of the ascidian egg. *Biol. Bull.* 63:381-386.
- Berril, N.J. 1935. Studies in tunicate development IV. Asexual reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. (B Biol. Sci.)* 225:327-379.
- Berril, N.J. 1975. Chordata: Tunicate, p. 241-282. *In* A. C. Giese & J.S. Pears (eds.). *Reproduction of marine invertebrates*. Chapter 8, Vol.II. Academic, Nueva York.
- Bingham, B.L. & C.M. Young. 1991. Influence of sponges on invertebrate recruitment: a field test of allelopathy. *Mar. Biol.* 109:19-26.
- Brunetti, R. 1976. Biological cycle of *Botrylloides leachi* (Savigny) (Asciacea) in Venetian Lagoon. *Vie Milieu* 26:105-122.
- Carballo, J.L., S. Naranjo, B. Kukurtzú & A. Hernández. 1997. Estudio de la población de *Ecteinascidia turbinata* Herdman 1880 (Asciacea: Perophoridae) en la isla de Formentera (Mar Mediterráneo, España): Distribución, densidad y crecimiento. *Ciencias del Mar*, UAS 15: 7-15
- Cloney, R.A. 1987. Phylum Urochordata, class Ascidian, p. 507-540. *In* M. F. Strathmair (ed.). *Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast*. University of Washington, Seattle.
- Millar, R.H. 1971. The Biology of Ascidiaceans, p.1-100. *In* F. S. Russell & M. Yonge (eds.). *Adv. Mar. Biol.* Vol. 9, Academic, Nueva York.
- Morgan, T.O. 1977. Growth rate, age at sexual maturity, longevity, and seasonality in three West Indian colonial ascidians. MSc. Thesis, University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.
- Nieves, J.M. 1995. Cáncer: "milagro bajo el mar". *Ciencia. Blanco y Negro*, Jul.-Agosto:37-39.
- Rinehart, K.H., T.G. Holt, N.L. Fregeau, J.G. Stroh, P.A. Keiper, F. Sun, L.H. Li & D.G. Martin 1990. Ecteinascidins 729, 743, 745, 579A, 759B, and 770 potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.* 55(15):452-455.
- Sabbadin, A. 1960. Ulteriori notizie sull'atterramento e sulla biologia dei Botrilli in condizioni di laboratorio. *Arch. o Oceanogr. Limnol.* 12:97-107.
- Satoh, N. 1984. *Developmental biology of ascidians*. Cambridge Univ. Press. 234 pp.
- Siegel, S 1974. *Estadística no paramétrica aplicada de las ciencias de la conducta*. Editorial Trillas, México. 346 pp.
- Simkins, C.S. 1924. Origin of the germ cells in *Ecteinascidia*. *Cont. Bermuda Biol. Sta. Res.* 144:295-317.
- Svane, I. & C.M. Young 1989. The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 27:45-90.
- Young, C.M. 1986. Direct observations of field swimming behavior in larvae of the colonial ascidians *Ecteinascidia turbinata*. *Bull. Mar. Scien.* 39(2):279-289.
- Young, C.M. & B.L. Bingham 1987. Chemical defense and aposematic coloration in larvae of the ascidian *Ecteinascidia turbinata*. *Mar. Biol.* 96:539-544.