

Morfología de la membrana coriónica de los huevos de *Octopus bimaculoides* y *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae)

Chorionic membrane morphology of the eggs of *Octopus bimaculoides* and *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae)

Pablo Monsalvo-Spencer, César Augusto Salinas-Zavala y Teodoro Reynoso-Granados.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Apartado Postal 128, La Paz, B.C.S., 23080. México
e-mail: treynoso04@cibnor.mx

Monsalvo-Spencer P., C. A. Salinas-Zavala y T. Reynoso-Granados. 2013. Morfología de la membrana coriónica de los huevos de *Octopus bimaculoides* y *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae). *Hidrobiológica* 23 (1): 124-129.

RESUMEN

Los huevos recién desovados de *Octopus bimaculoides* y de *O. hubbsorum* son de forma ovocilíndrica, miden 10.1 ± 1.4 y 2.1 ± 0.1 mm de longitud, respectivamente. La envoltura del huevo consta de dos partes principales: la membrana coriónica (corion) y el pedúnculo coriónico. El corion del huevo de *O. bimaculoides* presenta una sola capa, de un grosor de 8 μm , con poros menores a 1 μm de diámetro y una arquitectura interna en conexión con el pedúnculo coriónico. El corion del huevo de *O. hubbsorum* tiene un grosor de 4 μm , sin poros y una arquitectura interna sin interconexión con el pedúnculo coriónico. El pedúnculo coriónico del huevo de *O. hubbsorum* presenta un ensanchamiento anular a 300 μm de la unión con el cuerpo principal del corion. El huevo de *O. hubbsorum* tiene un micrópilo en forma de cavidad circular profunda de 15 μm de diámetro, en el centro del polo mayor del corion. En este estudio se describe por primera vez que la microestructura morfológica del corion es distinta en los huevos de *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum*.

Palabras clave: Corion, morfología, *Octopus bimaculoides*, *Octopus hubbsorum*, ultraestructura.

ABSTRACT

Recently spawned eggs of *Octopus bimaculoides* and *O. hubbsorum* are ovo-cylindrical in shape and have an average of 10.1 ± 1.4 and 2.1 ± 0.1 mm in length, respectively. The egg envelope consists of two main parts: the chorionic membrane (Chorion) and the chorionic peduncle. The chorion of *O. bimaculoides* eggs shows a single layer of 8 μm in thickness, with pores smaller than 1 μm in diameter, and the internal architecture of the chorion connects to the chorionic peduncle. The chorion of *O. hubbsorum* eggs has a thickness of 4 μm without pores, and the internal architecture of the chorion does not interconnect with the chorionic peduncle. The chorionic peduncle of *O. hubbsorum* eggs shows an annular width of 300 μm in the junction with the main body of the chorion. *O. hubbsorum* eggs have a micropyle shaped as a deep circular cavity, 15 μm in diameter in the center of the pole of the chorion. The micro-structure morphology of *O. bimaculoides* and *O. hubbsorum* eggs shows a differentiation between the chorion membranes, which is described in this study for the first time.

Key words: Chorion, morphology, *Octopus bimaculoides*, *Octopus hubbsorum*, ultrastructure.

INTRODUCCIÓN

En las especies de pulpos del suborden Incirrata (incluyendo los pulpos bentónicos de la familia Octopodidae), los huevos están envueltos por una membrana coriónica o corion (Villanueva & Norman, 2008) y en el extremo distal tienen un pedúnculo coriónico, con el cual se forman racimos de huevos durante el desove (Boletzky, 1998; Olivares *et al.*, 2001). Generalmente, en los huevos desovados, el corion asume la función de protección del embrión contra factores desfavorables del medio ambiente como la desecación, la infección bacteriana y la destrucción física, además, asegura la estabilidad en el interior del huevo con respecto al medio externo permitiendo el intercambio de gases y el mantenimiento del embrión en líquido vitelogenético (Budelman *et al.*, 1997). Sin embargo, los mecanismos físicos y químicos que promueven y regulan la función del corion no están descritos. En algunos grupos como el de los insectos, las estructuras coriónicas características de los huevos son diferentes en las distintas especies (Rogo *et al.*, 1992) y por ello podrían ser útiles para hacer consideraciones filogenéticas (Hinton, 1981). En los cefalópodos, el corion de los huevos no ha sido clasificado todavía de acuerdo a las características de sus estructuras, ni a su composición bioquímica.

En este trabajo se presentan las características morfológicas del corion de los huevos de las especies de pulpo *Octopus bimaculoides* Pickford y McConnaughey, 1949 y *O. hubbsorum* Berry, 1953, que forman parte de la pesquería de pulpo en el Pacífico Mexicano y Golfo de California (Sánchez, 2003; López-Urriarte *et al.*, 2005; Alejo-Plata *et al.*, 2009). Se describen por primera vez para estas especies los detalles de la microestructura superficial externa e interna del corion, la forma de unión con el pedúnculo coriónico y la existencia de un micropilo. Este estudio fue útil para determinar la existencia de diferencias entre las membranas coriónicas de los huevos de *Octopus bimaculoides* y *O. hubbsorum*, dichas diferencias podrían ser consideradas como características taxonómicas e incluso evolutivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron diez hembras de *Octopus bimaculoides* en mayo y ocho de *O. hubbsorum* en noviembre de 2011 en la Isla Magdalena, Baja California Sur, México (24°38'N; 112°08'W). En estos meses, las dos especies tienen las gónadas maduras (López-Peraza, 2009; Pliego-Cárdenas *et al.*, 2011).

Los pulpos fueron transportados al Laboratorio de Mantenimiento de Organismos Acuáticos del CIBNOR, en La Paz, B.C.S., México. Se distribuyeron en forma individual en jaulas de plástico de 50 x 27 x 25 cm, y dentro de ellas se colocó un tubo de PVCH de 4" como refugio. Los pulpos se mantuvieron en un sistema semiabierto a 17 °C y salinidad de 35 ups. La tasa de recambio de agua fue de 300% cada 24 h. Los pulpos fueron alimentados con jaibas

vivas (*Callinectes bellicosus* Simpson, 1859), cada 72 h. Las jaulas fueron limpiadas extrayendo las heces utilizando un sifón y el refugio fue revisado constantemente para detectar el desove.

Cinco racimos de huevos recién desovados de cada especie, fueron despegados de los refugios. De los racimos se separaron 50 huevos con pinzas y se colocaron en cajas de Petri de 100 mm de diámetro, con agua marina filtrada con un tamiz de 1 µm, a temperatura de 17 °C. Se determinaron las siguientes características morfométricas: longitud (L) y ancho (W) del huevo y longitud del pedúnculo coriónico (LP). Las medidas se realizaron con un micrómetro ocular adaptado a un microscopio estereoscópico. La morfología macroscópica del huevo se registró con imágenes obtenidas con una cámara fotográfica conectada a un microscopio estereoscópico. Se estudió la microestructura superficial del corion de 20 huevos de cada especie, mediante el análisis de las imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido modelo Hitachi S-300N (Murphy & Roomans, 1984; Bozzola & Russell, 1999). Las muestras de huevos analizadas de cada especie fueron del mismo lote de desove. El corion fue obtenido por disección, separándolo del huevo, abriendo este último, en forma longitudinal y ventral, para extraer el embrión. El corion aislado fue cortado en forma transversal en las regiones polares y longitudinalmente en la zona central, quedando dividido en cuatro partes que fueron fijadas 2 horas en una solución 2.5% de glutaraldehído a 4 °C. Después, fueron lavados tres veces durante 1 h en agua de mar sintética a un pH de 7.4 a 4 °C. Gradualmente, el agua de mar fue sustituida por una solución amortiguadora de cacodilato de sodio, hasta el 100%, a un pH de 7.4. En seguida, se deshidrataron en una serie de etanol al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% y posteriormente las muestras fueron secadas a punto crítico con un equipo Samdri PVT-3B y al final fueron cubiertos con paladio, en un recubridor Denton Vacuum Desk II.

A partir de los datos morfométricos de los huevos se obtuvo el promedio y la desviación estándar ($n = 50$).

RESULTADOS

Las hembras de *Octopus bimaculoides* desovaron entre 15 y 20 días después de la recolecta y las de *O. hubbsorum* lo hicieron entre 20 y 24 días después. Las hembras de las dos especies murieron al final del cuidado parental de los huevos: *O. bimaculoides* a los 60 días y *O. hubbsorum* a los 40 días después del desove.

Las características morfométricas de los huevos de *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum* se muestran en la Tabla 1. Los huevos de *O. bimaculoides* tienen forma ovocilíndrica y son desovados en forma de racimos, unidos directamente a la superficie interna del refugio (Fig. 1). Los huevos frescos son suaves, el embrión con vitelo tiene un color blanquecino, inmerso en líquido perivitelino y delimitado por una membrana coriónica delgada, transparente y flexible, que permite ver al embrión que hay en el interior. El hue-

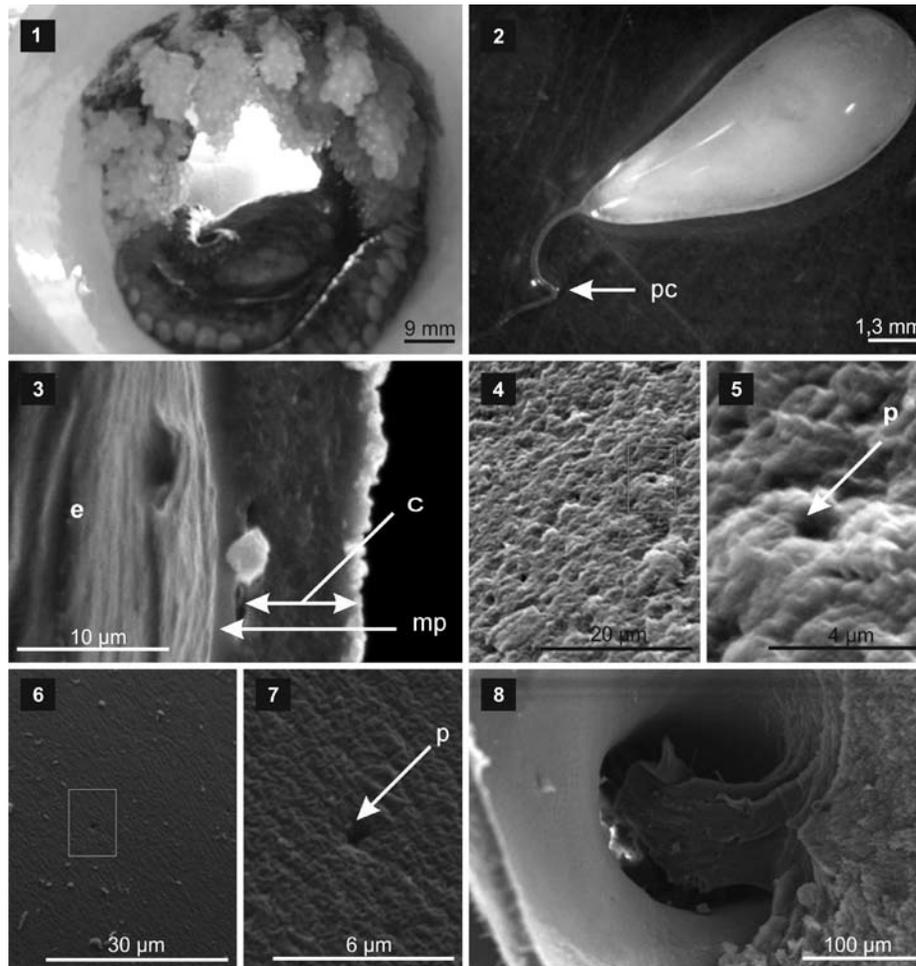
Tabla 1. Características morfométricas de los huevos de *Octopus bimaculoides* y *O. hubbsorum* (n = 50). Los ejemplares de ambas especies presentaron una longitud de manto de 120 ± 2 mm y un peso total de 660 ± 60 g.

Especie	Longitud de huevos (mm)		Ancho de huevos (mm)		Longitud del pedúnculo coriónico (mm)	
	Promedio \pm SD	Rango	Promedio \pm SD	Rango	Promedio \pm SD	Rango
<i>Octopus bimaculoides</i>	10.1 ± 1.4	7.5-10.3	3.3 ± 0.2	2.8-3.5	8.5 ± 0.5	8-9.2
<i>Octopus hubbsorum</i>	2.1 ± 0.1	2.0-2.2	0.75 ± 0.05	0.7-0.8	6.2 ± 0.3	6.0-6.5

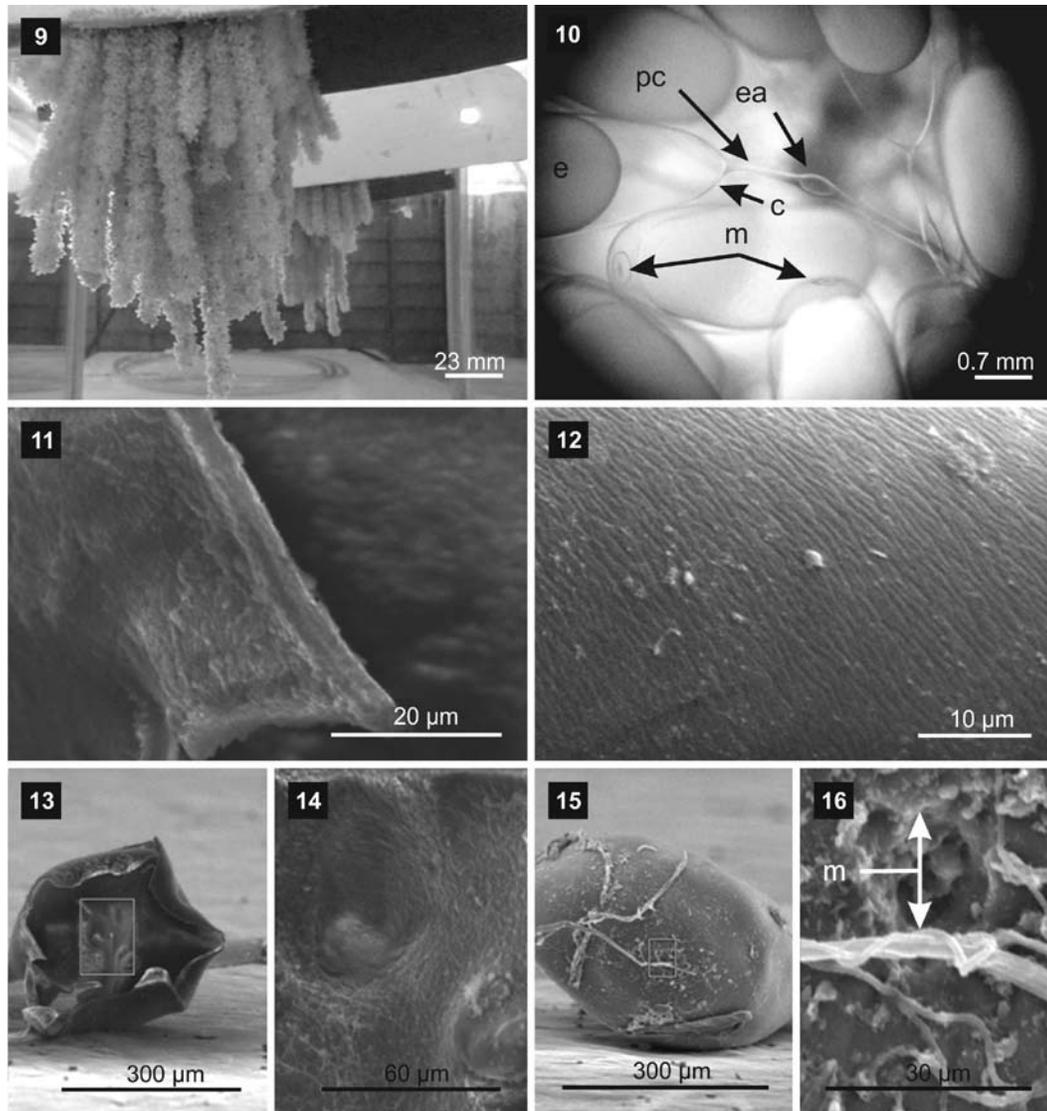
vo tiene un pedúnculo coriónico en el polo menor (extremo apical del huevo) (Fig. 2). En el microscopio estereoscópico, la superficie del corion mostró una apariencia lisa.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran diferencias en la micromorfología del corion de los huevos de *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum*.

En las imágenes de microscopía de barrido, pudo apreciarse que el corion del huevo de *O. bimaculoides*, tiene un grosor de $8 \mu\text{m}$ (Fig. 3). En la superficie externa y en la superficie interna del corion, existen poros con un diámetro menor a $1 \mu\text{m}$ (Figs. 4-7). La unión interna del cuerpo del corion con el pedúnculo coriónico es continua no existiendo una división entre ellos (Fig. 8).



Figuras 1-8. Morfología del huevo de *Octopus bimaculoides*. 1) Racimos de huevos, imagen tomada con cámara digital en caja de petri. 2) Huevo separado del racimo: pc, pedúnculo coriónico, imagen tomada con microscopio estereoscópico. 3) Micro imagen del huevo: c, corion; mp, material perivitelino; e, embrión, imagen tomada con microscopio electrónico de barrido. 4), 5), 6) y 7) Superficie externa y superficie interna del corion: p, poro, imágenes tomadas con microscopio electrónico de barrido. 8) Unión interna del corion con el pedúnculo coriónico, imagen tomada con microscopio electrónico de barrido.



Figuras 9-16. Morfología del huevo de *Octopus hubbsorum*. 9) Racimos de huevos, imagen tomada con cámara digital. 10) Huevo separado del racimo: c, corion; e, embrión; ea, ensanchamiento anular; pc, pedúnculo coriónico; m, micrópilo, imagen tomada con microscopio estereoscópico. 11) Vista del corte longitudinal del corion del huevo, imagen tomada con microscopio electrónico de barrido. 12) Superficie externa del corion, imagen tomada con microscopio electrónico de barrido. 13) y 14) Unión interna del corion con el pedúnculo coriónico, imágenes tomadas con microscopio electrónico de barrido. 15) y 16) Vista frontal del micrópilo del corion: m, micrópilo, imagen tomada con microscopio electrónico de barrido.

Los huevos de *O. hubbsorum*, fueron desovados en racimos (Fig. 9) y presentan una forma, apariencia, y consistencia similar a los huevos de *O. bimaculoides*, aunque son de menor tamaño. En las fotografías con microscopio estereoscópico, el pedúnculo coriónico mostró un ensanchamiento anular, a una distancia de 300 μm de la unión con el cuerpo del corion. En el polo mayor del corion (extremo basal del huevo) se localiza el micrópilo (Fig. 10).

Con las imágenes de microscopía de barrido, fue posible observar que el corion del huevo de *O. hubbsorum* tiene un grosor de 4 μm (Fig. 11), y que las superficies interna y externa carecen

de poros (Fig. 12). La unión interna del cuerpo del corion con el pedúnculo coriónico, no es continua, ya que existe una división en forma de tabique entre los mismos (Fig. 13-14). El micrópilo, ubicado al centro del polo mayor del corion, es cerrado y corresponde a una cavidad circular profunda, de 15 μm de diámetro (Fig. 15-16).

DISCUSIÓN

Las características macromorfológicas de los huevos de pulpos han sido descritas por varios autores (Naef, 1928; Mangold *et al.*,

1971; Boletzky, 1989). En términos generales, los huevos de pulpo solo tienen una membrana coriónica protectora del embrión inmerso en líquido perivitelino. (Mangold *et al.*, 1971; Boletzky, 1998; Villanueva & Norman, 2008). En los huevos de calamares, el líquido perivitelino es considerado un tranquilizante natural que evita la rápida eclosión de las paralarvas (Marthy *et al.*, 1976), sin embargo, su presencia en los huevos de pulpo no ha sido evaluada todavía. Se considera que los pulpos productores de paralarvas planctónicas, forman huevos pequeños (1.5-5 mm), como ocurre en *O. hubbsorum*, y que los pulpos productores de paralarvas bentónicas forman huevos grandes (> 10 mm) (Hochberg *et al.*, 1992; Boletzky *et al.*, 2002), como se ha documentado para *O. bimaculoides* (Forsythe & Hanlon, 1988). Según la especie de pulpo, los huevos poseen un pedúnculo coriónico de cierta longitud, que los une entre sí, formando racimos (Boletzky, 1989; Huffard & Hochberg, 2005). Esto se observó en los resultados de la morfometría de los huevos de ambas especies estudiadas: *O. bimaculoides* y de *O. hubbsorum*. También se ha señalado que la variación de la longitud de los pedúnculos coriónicos de los huevos está más relacionada con la cantidad de huevos por racimo que con el tamaño de los huevos de los mismos (Villanueva *et al.*, 1995; Ortiz *et al.*, 2006).

En este trabajo, el examen de los huevos con microscopio electrónico de barrido (MEB), mostró que el corion de los huevos de *Octopus bimaculoides* y de *O. hubbsorum* son diferentes, en la micromorfología de la superficie del corion y en las estructuras presentes en los dos polos del mismo, especialmente el polo mayor, donde se sitúa el micrópilo. En imágenes de MEB, se observó la existencia de poros en el corion del huevo de *O. bimaculoides*, lo cual no había sido reportado con anterioridad. En trabajos acerca del corion de huevos de peces teleosteos, como el salmón, *Salmo salar* Linnaeus, 1758, se ha sugerido que la presencia de poros facilita la difusión de gases y productos metabólicos de desecho (Iconomidou *et al.*, 2000) y además permiten la comunicación entre las capas del corion (Jaramillo *et al.*, 2009; 2012).

Se ha reportado que el corion de los huevos de pulpo, tiene características físicas y químicas que permiten la estabilidad del huevo (Budelmann *et al.*, 1997) y evitan que moléculas grandes liberadas por el embrión y contenidas en el líquido perivitelino abandonen el huevo (Boletzky, 2003). Sin embargo, el mecanismo del tipo de paso de sustancias, ya sea pasivo (O₂, CO₂, agua, urea, glucosa) y/o activo (aminoácidos, polipéptidos, vitaminas), no está determinado todavía.

Los huevos de *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, carecen de micrópilo y las paralarvas al tiempo de la eclosión rompen el polo mayor del corion (extremo basal del huevo), con la glándula de eclosión u órgano de Hoyle's (Villanueva & Norman, 2008). En el huevo de *O. hubbsorum*, el micrópilo se encuentra precisamente en el polo mayor del corion y aunque su función no es clara podría estar relacionado con la eclosión de las paralarvas, ya que el

corion se alarga y adelgaza, conforme avanza el desarrollo de la paralarva (Uriarte *et al.*, 2009). Por otra parte, su función también podría estar relacionada para facilitar el paso de los espermatozoides para la fecundación del huevo, antes de la puesta, ya que el corion del huevo está formado.

Dado que en este trabajo, se describen diferencias en la micromorfología del corion de los huevos de *O. bimaculoides* y *O. hubbsorum*, sería conveniente realizar estudios de microestructura de los huevos de otras especies de pulpos para determinar si la micromorfología del corion puede reflejar la filogenia de especies, géneros o familias. Además, sería relevante estudiar el mecanismo de la permeabilidad del corion, para comprender la influencia del mismo en el desarrollo del embrión, considerando el efecto de factores ambientales, como temperatura y salinidad, lo cual ayudaría a optimizar la obtención de paralarvas de pulpos en laboratorios de acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia de Ariel Arturo Cruz Villacorta en la operación del microscopio electrónico de barrido. A Laura Ibarra por la toma de fotografías con el microscopio estereoscópico y a Gerardo Rafael Hernández García por la edición de las fotografías. A Diana Leticia Dorantes Salas por la revisión del resumen en inglés.

REFERENCIAS

- ALEJO-PLATA, M. C., J. L. GÓMEZ-MÁRQUEZ, S. RAMOS-CARRILLO & J. E. HERRERA-GALINDO. 2009. Reproducción, dieta y pesquería del pulpo *Octopus (Octopus) hubbsorum* (Mollusca, Cephalopoda) en la costa de Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical* 57: 63-78.
- BOLETZKY, S. V. 1989. Recent studies on spawning, embryonic development and hatching in the cephalopoda. *Advances in Marine Biology* 44: 143-203.
- BOLETZKY, S. V. 1998. Cephalopod eggs and egg masses. *Oceanography and Marine Biology: Annual Review* 36: 341-371.
- BOLETZKY, S. V., M. FUENTES & N. OFFNER. 2002. Developmental features of *Octopus macropus* Risso, 1826 (Mollusca, Cephalopoda). *Vie Milieu* 52 (4): 209-216.
- BOLETZKY, S. V. 2003. Biology of early life stages in Cephalopod molluscs. *Advances in Marine Biology* 44: 143-203.
- BOZZOLA, J. J. & L. D. RUSSELL. 1999. *Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists*. (2d. ed.). Jones & Bartlett Publishers (Boston), USA. 670 p.
- BUELMANN, B., R. SCHIPP, & S. V. BOLETZKY. 1997. Cephalopoda. In: Harrison, F. W. & A. J. Kohn (Eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Volume 6A. New York: Wiley-Liss, pp. 119-414.

- FORSYTHE, J. W. & R. T. HANLON. 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Marine Biology* 98: 369-379.
- HINTON, H. E. 1981. *Biology of insect eggs*. Pergamon Press. Oxford. Vol. 3. 1125 p.
- HOCHBERG, F. G., L. D. NIXON & R. B. TOLL. 1992. Order Octopoda Leach 1818. *Smithsonian Contributions to Zoology* 513: 213-280.
- HUFFARD, C. L. & F. G. HOCHBERG. 2005. Description of a new species of the genus *Amphioctopus* (Mollusca: Octopodidae) from the Hawaiian Islands. *Molluscan Research* 25: 113-128.
- ICONOMIDOU V. A., D. G. CHRYSIKOS, V. GIONIS, M. A. PAVLIDIS, S. J. HAMODRAKAS. 2000. Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Journal of Structural Biology* 132: 112-122.
- JARAMILLO R., O. GOICOECHEA, O. GARRIDO & E. MOLINARI. 2009. *Salmo salar*: Morfología ultraestructural de la pared del corion en ovas normales y con problemas de eclosión. *Archivos de Medicina Veterinaria* 41: 67-71.
- JARAMILLO R., O. GOICOECHEA, O. GARRIDO & E. MOLINARI. 2012. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal y del corion duro de *Salmo salar*. *Archivos de Medicina Veterinaria* 44: 59-65.
- LÓPEZ-PERAZA, D. J. 2009. Descripción histológica de los estadios de madurez gonadal en los pulpos *Octopus bimaculoides* y *Octopus rubescens*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 81 p.
- LÓPEZ-URIARTE, E., E. RÍOS-JARA & M. PÉREZ-PEÑA. 2005. Range extension for *Octopus hubbsorum* (Mollusca: Octopodidae) in the Mexican Pacific. *Bulletin of Marine Science* 7 (2): 171-175.
- MANGOLD, K., S. V. BOLETZKY & D. FRÖSCH. 1971. Reproductive biology and embryonic development of *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda: Octopoda). *Marine Biology* 8: 109-117.
- MARTHY, H. J., R. HAUSER & A. SCHOO. 1976. Natural tranquilizer in cephalopod eggs. *Nature* 261: 496-497.
- MURPHY, J. A. & G. M. ROOMANS (Eds.). 1984. *Preparation of Biological specimens for scanning electron microscopy*. Scanning Electron Microscopy, Inc., AMF O'Hare, Il. 344 p.
- NAEF, A. 1928. Die Cephalopoden. Fauna Flora Golf. Neapel. 1. Teil, II. *Embryologie* 35: 1-357.
- OLIVARES, P. A., M. ZAMORA-COVARRUBIAS, P. PORTILLA-REYES & O. ZUÑIGA-ROMERO. 2001. Estudio histológico de la ovogénesis y maduración ovárica en *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae) de la II Región de Chile. *Estudios Oceanológicos* 20: 13-22.
- ORTIZ, N., M. E. RÉ & F. MÁRQUEZ. 2006. First description of eggs, hatchlings and hatchling behaviour of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Plankton Research* 28 (10): 881-890.
- PLIEGO-CÁRDENAS R., F. A. GARCÍA-DOMÍNGUEZ, B. P. CEBALLOS-VÁZQUEZ, M. VILLALEJO-FUERTE & M. ARELLANO-MARTÍNEZ. 2011. Reproductive aspects of *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae) from Espíritu Santo Island, southern Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas* 37 (1): 23-32.
- ROGO, L. M, E. D. KOKWARO, M. J. MUTINGA & C. P. KHAMALA. 1992. La diferenciación de las especies de vectores de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) en Kenia por la escultura coriónica de sus huevos. *Journal of Medical Entomology* 29: 1042-1044.
- SÁNCHEZ, P. 2003. Cephalopods from off the Pacific coast of Mexico: Biological aspects of the most abundant species. *Scientia Marina* 67 (1): 81-90.
- URIARTE, I., O. ZUÑIGA, A. OLIVARES, V. ESPINOZA, V. CERNA, A. FARIAS & C. ROSAS. 2009. Morphometric changes and growth rate during embryonic development of *Robsonella fontaniana*. *Vie et Milieu- Life and Environment* 59 (3/4): 315-323.
- VILLANUEVA, R., C. NOZAISAND & S. V. BOLETZKY. 1995. The planktonic life of octopuses. *Nature* 377: 1-107.
- VILLANUEVA, R. & M. D. NORMAN. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and Marine Biology* 46: 105-202.

Recibido: 29 de agosto del 2012.

Aceptado: 29 de enero del 2013.