

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Grado de Biología

Trabajo de Fin de Grado

Descripción de la paralarva del calamar ommastréfido *Todarodes sagittatus*, obtenida por fertilización *in vitro*



Autor: Catarina Padilha Pires Martins
Tutor interno: Manuel Ballesteros
Tutores externos: Fernando A. Fernández-
Álvarez y Roger Villanueva
Entidad: Institut de Ciències del Mar, CSIC
Data de presentació: Julio 2015

AGRADECIMIENTOS

Querría expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado directa o indirectamente en la realización del presente trabajo. En especial, a Fernando Fernández y al Dr. Roger Villanueva, mis tutores en el ICM, mi más profundo y sincero agradecimiento por el seguimiento continuo y motivación. Así como por su admirable capacidad didáctica y paciencia. Y en definitiva, por confiar en mi y brindarme la oportunidad de colaborar en este grupo de investigación.

Doy las gracias también al Dr. Manuel Ballesteros, mi tutor en la universidad, por su apreciado apoyo y orientación. Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto "Cultivo larvario de calamares oceánicos" (AGL2012-39077) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad

ABSTRACT

Little is known about the early life stages of oceanic squid, yet such information is critical to a meaningful understanding of this ecologically and economically important group. Major limitations to the study of these stages derive from the difficulty of species correct identification and the fact that currently, the larval forms of many species are still unknown.

This work describes the morphology and chromatophore pattern of the ommastrephid squid *Todarodes sagittatus* paralarvae. Morphological characteristics, such as the peg number of the proboscis suckers, and chromatophore pattern, provide valuable taxonomical tools to discriminate the paralarvae of *T. sagittatus* from other ommastrephid species described to date. Using *in vitro* fertilization techniques, fertilized eggs were obtained and incubated at 15 and 17 °C until hatchling stage. The fertilization and survival rates of these experiments were low and, as observed in other oceanic squid fertilized *in vitro*, all individuals hatched prematurely. By comparing the final developmental stages of this species, we also attempted to identify its natural hatching stage. In agreement with the putative morphological features of a *rhynchoteuthion* hatchling in nature, developmental stage XXXII is here proposed as this species natural hatchling stage. Furthermore, hatchling behaviour, including proboscis extension, is also reported. This work thus highlights the morphological features of *T. sagittatus* paralarvae, hopefully contributing to our knowledge of *rhynchoteuthion* paralarvae.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Calamares ommastréfidos del Mar Mediterráneo.....	1
1.1.1. Características generales de la biología de <i>Todarodes sagittatus</i>	1
1.2. El estudio de la primera fase del ciclo vital de cefalópodos.....	4
1.2.1. Generalidades de las paralarvas <i>rhynchoteuthion</i>	4
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGÍA.....	6
3.1. Recolección de ejemplares.....	6
3.2. Técnicas de fertilización.....	8
3.2.1. Obtención de gametos.....	8
3.2.2. Mezcla de gametos.....	9
3.3. Selección de los huevos y determinación de la tasa de fertilización	10
3.4. Incubación de los huevos y determinación de la tasa de supervivencia	10
3.5. Determinación del estadio de recién nacido.....	11
3.6. Descripción morfológica y patrón de cromatóforos de las paralarvas	11
3.7. Observación de paralarvas con microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning electron microscopy</i> , SEM).....	12
3.8. Observaciones sobre el comportamiento de extensión de la probóscide de paralarvas	13
4. RESULTADOS	13
4.1. Fertilización <i>in vitro</i> , supervivencia, incubación y eclosión de los huevos.....	13
4.2. Descripción de paralarvas recién nacidas	14
4.2.1. Descripción morfológica general.....	14
4.2.2. Morfología externa	15
4.2.3. Morfología interna.....	16
4.2.4. Anatomía externa observada con SEM	17
4.2.4.1. Análisis detallado de la zona bucal	17
4.2.4.2. Análisis detallado de las ventosas	17
4.2.4.3. Análisis de la superficie de cabeza y manto	17
4.2.5. Análisis morfométrico de paralarvas en los estadios XXX, XXXII y XXXIV según la escala propuesta por Watanabe et al. 1996.....	19
4.2.5.1. Estadio XXX.....	19
4.2.5.2. Estadio XXXII	19
4.1.1.1. Estadio XXXIV.....	19

4.1.2. Descripción del patrón de cromatóforos de paralarvas en los estadios XXX, XXXII y XXXIV	21
4.1.2.1. Estadio XXX	21
4.1.2.2. Estadio XXXII	22
4.1.2.3. Estadio XXXIV	22
4.2. Observaciones comportamentales	22
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIÓN.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	29
8. ANEXO	33

ABREVIATURAS

AC	Anchura de la cabeza
AP	Anchura de la probóscide
DO	Diámetro del ojo
FSW	<i>Filtered Sea Water</i>
FSW + A	<i>Filtered Sea Water</i> con antibiótico
LBII	Longitud del brazo II
LC	Longitud de la cabeza
LDM	Longitud dorsal del manto
LPmax	Longitud de la probóscide durante máxima extensión
LPrep	Longitud de la probóscide en reposo
LS	Longitud del sifón
LT	Longitud total
LTsP	Longitud total sin probóscide
LVM	Longitud ventral del manto
TE	Tiempo de extensión

1. INTRODUCCIÓN

Los cefalópodos son una clase de moluscos marinos de especial interés evolutivo y ecológico. Presentan unas notables adaptaciones estructurales, sensoriales y motoras y una importante diversidad de modos de vida (Boletzky, 2003). Además, en los ecosistemas marinos también son importantes vectores de nutrientes (Young et al., 2013). Entre los cefalópodos, los calamares se subdividen en Myopsida Orbigny, 1841 y Oegopsida Orbigny, 1845. Los calamares Myopsida son de hábitat casi exclusivamente nerítico, en cambio los calamares Oegopsida son de hábitat típicamente oceánico y se distribuyen en 26 familias (Jereb, & Roper, 2010).

1.1. Calamares ommastreífidos del Mar Mediterráneo

Ommastrephidae Steenstrup, 1857 es una familia de calamares oceánicos con representantes en todos los mares y océanos, que se caracterizan por tener un crecimiento rápido y un período de desove corto, como episodio final de la fase adulta (Jereb, & Roper, 2010). Son de gran importancia pesquera y representan aproximadamente la mitad del volumen total de capturas mundiales de cefalópodos (FAO 2014). En el Mar Mediterráneo habitan cuatro especies de esta familia: *Illex coindetii* (Vérany, 1839), *Todaropsis eblanae* (Ball, 1841), *Todarodes sagittatus* (Lamarck, 1798) y *Ommastrephes bartramii* (Lesueur, 1821), todas ellas de interés comercial.

1.1.1. Características generales de la biología de *Todarodes sagittatus*

Todarodes sagittatus es una especie nerítica y oceánica, que vive sobre la plataforma y talud continentales en el Atlántico Oriental desde el Golfo de Guinea hasta el Ártico, incluyendo el Mar Mediterráneo, Mar de Mármara y el Mar del Norte (Jereb, & Roper, 2010). Se puede encontrar desde capas superficiales hasta profundidades superiores a 1000 m (Jereb, & Roper, 2010) pero en el Mar Mediterráneo se distribuye habitualmente entre los 400 y 800 metros de profundidad (Quetglas et al., 1998). Esta especie de manto alargado y musculoso, anchas aletas y corona braquial robusta, realiza migraciones verticales (Quetglas, & Morales-Nin, 2004) y movimientos ontogenéticos batimétricos de los individuos inmaduros hacia el talud continental y aguas más profundas (Quetglas et al., 1998). Son organismos voraces y oportunistas que se alimentan de peces, crustáceos y moluscos, depredando activamente durante las migraciones verticales hacia capas profundas (Rosas-Luis et al., 2014). En el Mar Mediterráneo, entre los cefalópodos, es la presa más importante en la dieta del pez espada, siendo depredado también por el marlín del mediterráneo, atunes, tiburones y rayas (Laptikhovsky, 2013; Romeo et al. 2012). Los ejemplares subadultos y adultos

recién capturados son de color rojo burdeos, pero los machos pierden la piel al ser capturados por pesca de arrastre, lo cual provoca que sean de un color blanquecino y evidencia la diferencia entre machos y hembras a simple vista. Los machos también se diferencian por tener el brazo IV derecho hectocotilizado (Fig. 1D).

En el Mediterráneo, los machos maduros normalmente presentan una longitud de manto alrededor de 230 mm, mientras que las hembras empiezan la maduración a partir de los 300 mm de longitud de manto (Jereb, & Roper, 2010). En los machos, el sistema reproductor (Fig. 1B) está formado por el testículo (donde el espermatozoides es producido) y un complejo espermatofórico formado por: la glándula espermatofórica (donde se forman los espermatozoides), el conducto deferente, el saco espermático (donde se almacenan los espermatozoides) y el órgano terminal, por donde son expulsados los espermatozoides durante la cópula. El sistema reproductor de las hembras (Fig. 1A) está compuesto por un ovario, dos oviductos (estructuras tubulares que conducen los oocitos desde el ovario al exterior), y dos tipos de glándulas accesorias: las glándulas oviductales y las glándulas nidamentales.

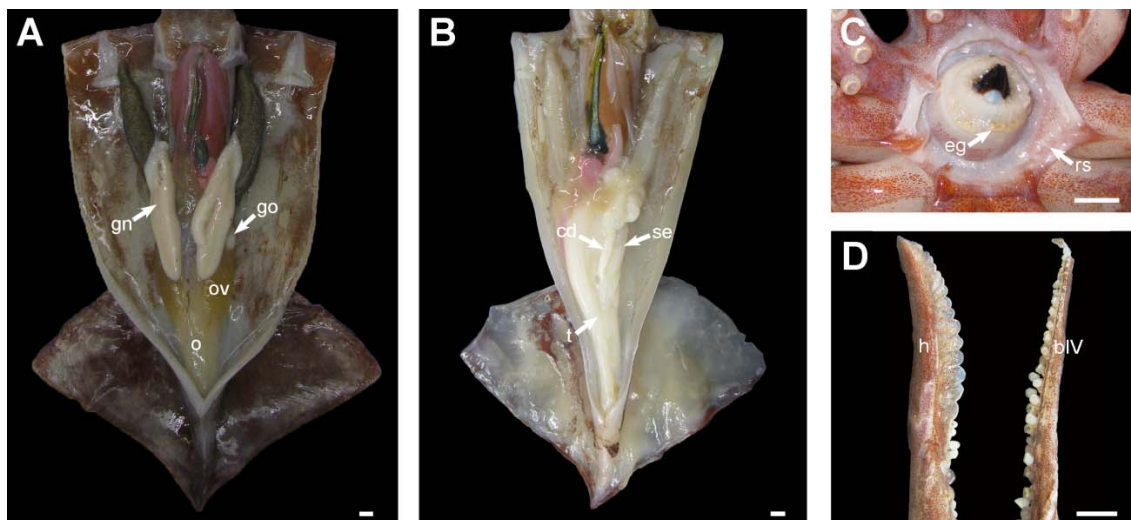


Fig. 1. *Todarodes sagittatus*. Anatomía reproductora de (A) una hembra y (B) un macho maduros. (C) Detalle de la masa bucal de una hembra copulada (con presencia de espermatangios). (D) Visión ventral del hectocotilo y brazo IV izquierdo de un macho maduro. Escala: 1 cm. (bIV, brazo IV izquierdo; cd, conducto deferente; eg, espermatangios; gn, glándula nidamental; go, glándula oviductal; h, hectocotilo; o, ovario; ov, oviducto; rs, receptáculos seminales; se, saco espermático).

Los calamares ommastréfidos se consideran monocíclicos, con un único periodo de madurez sexual situado al final de su ciclo vital. Como otros miembros de esta familia, *T. sagittatus* presenta una puesta intermitente, liberando los huevos en varias puestas secuenciales durante este período de desove (Rocha et al., 2001). En el Mediterráneo Occidental, el período de reproducción de esta especie podría empezar en julio y alargarse hasta enero (Quetglas et al., 1998). Previo al período de reproducción, los machos empaquetan el espermatozoides en estructuras denominadas espermatozoides.

Durante la cópula, estas estructuras experimentan la reacción espermatofórica, un proceso complejo de evaginación que provoca su implantación en la región peribucal de las hembras (Marian, 2015). La reacción espermatofórica ocurre de forma autónoma y depende de la presión osmótica generada por la entrada de agua de mar en el espermatóforo. Los espermatóforos que han sufrido estos cambios y se encuentran adheridos a la hembra, reciben el nombre de espermatangios (Fig. 1C). Estas estructuras permiten el almacenaje de esperma y que la hembra pueda esperar a condiciones favorables para el desove. Pese a que se encuentran hembras

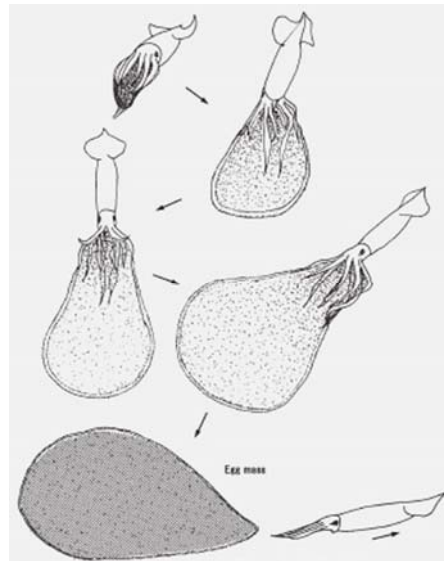


Fig. 2. Representación esquemática del comportamiento de desove de *Todarodes pacificus* observado en acuario (extraído y modificado de Sakurai et al., 2003).

maduras durante todo el año, en el Mediterráneo Occidental la época de puesta se estima que es principalmente de septiembre a diciembre (Quetglas et al., 1998). Durante el desove, la hembra libera los huevos, los cuales miden aproximadamente 1,1 mm de diámetro en hembras del Mediterráneo (Laptikhovsky, 2013), en el interior de frágiles masas gelatinosas y semitransparentes, probablemente con formas esféricas o elipsoides como ocurre en la especie congénere *Todarodes pacificus* (Bower, & Sakurai, 1996) (Fig. 2). Al liberar los oocitos a través del oviducto, éstos son recubiertos por una substancia producida por la glándula oviductal. Esta substancia, aún no identificada hasta la fecha en ninguna especie de cefalópodo, favorece la expansión de la membrana que recubre el huevo: el corion (Ikeda et al., 1993). La correcta expansión coriónica es un fenómeno crucial para asegurar la supervivencia y normal desarrollo del embrión. Asimismo, las glándulas nidamentales posiblemente también están implicadas en la protección de los huevos. Se cree que estas glándulas, que se desarrollan considerablemente en tamaño durante la maduración sexual de los individuos, podrían tener un papel en la formación de algunas de las capas que rodean los huevos y ser responsables de la matriz gelatinosa de las puestas.

Aunque todavía no existen avistamientos identificados de masas de huevos de esta especie en la naturaleza, se sospecha que en los ommastréfidos estas masas pelágicas son liberadas en la columna de agua y se acumulan en las picnoclinas de la zona mesopelágica (Staaf et al., 2008), flotando con las corrientes y posiblemente en ambientes favorables para el desarrollo embrionario y la eclosión de las paralarvas

(Robin et al., 2014) (Fig. 3). Aunque se haya sugerido que en el Mediterráneo Occidental el desove de *T. sagittatus* podría ocurrir en aguas profundas, a partir de los 500 metros de profundidad (Quetglas, & Morales-Nin, 2004), existe muy poca información sobre el área de puesta en esta zona. Dada la escasa información sobre las masas de huevos y la dificultad en obtener puestas en acuario, las técnicas de fertilización *in vitro* se presentan, pues, como interesantes alternativas para el estudio de embriones y paralarvas.



Fig. 3. Masa de huevos del calamar ommastréfido *Nototodarus gouldi* observada en la naturaleza (extraído de O'Shea et al., 2004).

1.2. El estudio de la primera fase del ciclo vital de cefalópodos

Pese a no tener una marcada metamorfosis larvaria, los recién nacidos de calamares y algunas especies de pulpos se diferencian ecológica y morfológicamente del adulto y durante un período presentan vida planctónica, siendo denominados, pues, paralarvas (Young, & Harman, 1988). Si bien el estudio de las fases embrionarias y paralarvarias es indispensable para determinar la ecología y dinámica de poblaciones, especialmente en este grupo de animales caracterizados por un ciclo de vida breve, el conocimiento existente sobre estas fases iniciales de desarrollo es aún muy escaso.

El estudio de las larvas de cefalópodos está limitado por la falta de información taxonómica de muchas especies, esencial para la correcta identificación de ejemplares. La taxonomía de las primeras fases de vida se presenta como uno de los grandes obstáculos a superar dado que la identificación de los estadios paralarvarios y juveniles de cefalópodos ha sido, y sigue siendo, en muchos casos confusa y problemática (Zaragoza et al., 2015). Por otro lado, el recién nacido de muchas especies y de algunas familias enteras de cefalópodos aún se desconoce (Zaragoza et al., 2015), y el conocimiento de su morfología deberá ayudar a elucidar la biología y ecología de esta fase. En este sentido, la fertilización *in vitro* y el cultivo larvario, se muestran como técnicas que pueden ayudar a responder estas cuestiones.

1.2.1. Generalidades de las paralarvas *rhynchoteuthion*

Todas las especies de ommastréfidos nacen con una morfología característica denominada *rhynchoteuthion*. Estas paralarvas poseen en la cabeza una estructura en forma de trompa, denominada probóscide, con 8 ventosas en el extremo distal en el

momento de nacer, que con el tiempo dará lugar a los tentáculos. Su función exacta aún no se conoce. La probóscide, que se mantiene y crece como una sola estructura durante la fase de paralarva, se forma al final del desarrollo embrionario con la fusión gradual de los tentáculos desde la base (Shea, 2005). Durante el desarrollo de la paralarva, la probóscide empieza a dividirse longitudinalmente por su base y la separación total de los tentáculos es el criterio utilizado para determinar el inicio de la fase juvenil (Young, & Harman, 1988). Diferentes estudios han conseguido paralarvas *rhynchoteuthion* producidas por fecundación artificial en laboratorio, capturadas mediante redes de plancton o recolectadas a partir de masas de huevos liberadas en el medio natural. En acuario sólo está documentado el desove de *Illex illecebrosus* (O'Dor, & Balch, 1985), *T. pacificus* (Bower, & Sakurai, 1996) y *Dosidicus gigas* (Staaf et al., 2008), y en la naturaleza sólo se han descubierto puestas atribuidas a *Sthenoteuthis pteropus* (Laptikhovsky, & Murzov, 1990), *Nototodarus gouldi* (O'Shea et al., 2004) y *D. gigas* (Staaf et al., 2008). En las últimas dos especies, la identificación de los embriones fue confirmada mediante métodos moleculares.

Aunque no se conoce cómo se produce la eclosión en la naturaleza de los recién nacidos de ommastréfidios, en los estudios de fertilización *in vitro* y de puestas inducidas en acuario los embriones eclosionan antes de completar la formación de las aletas, la bolsa de la tinta y de desarrollar la capacidad de extender la probóscide. En la actualidad, se considera que éstas son las principales características que definen el recién nacido (Sakai et al., 1998), lo cual implica que, al menos en condiciones de laboratorio, todas las especies de ommastréfidios investigadas hasta el momento eclosionan prematuramente (Villanueva et al., 2012).

En lugar de un estadio de eclosión bien definido por características morfológicas y/o fisiológicas, se ha sugerido que el embrión posee una fase de competencia, durante la cual puede eclosionar (Boletzky, 2003). Además, posiblemente, las características del recién nacido son diferentes entre especies (Boletzky, 2003). De este modo, debido a la eclosión prematura del embrión y la dificultad para determinar su condición fisiológica natural durante ese momento, la asignación del término "recién nacido" de una especie puede ser una cuestión ambigua. Por esta razón, el seguimiento de la fase terminal del desarrollo embrionario y de los factores que lo controlan pueden también proporcionar valiosa información.

El órgano de Hoyle, situado en el extremo distal del manto en embriones avanzados de cefalópodos, segrega enzimas que promueven la digestión local del corion, facilitando su rotura en el momento del nacimiento. Este órgano se vuelve funcional muy temprano en el desarrollo (Boletzky, 2003), posibilitando la eclosión prematura del

embrión. Ello implica que en el momento de la eclosión, algunos órganos internos del embrión todavía no estén completamente desarrollados y a la vez que su cavidad del manto todavía esté ocupada por una gran masa de vitelo interno. El proceso de eclosión comienza con el embrión incrementando las contracciones del manto y el movimiento de las aletas, y empujando el órgano de Hoyle contra la pared interior del corion. Una vez el corion es perforado, el embrión se propulsa a través de la apertura contrayendo el manto y moviendo las aletas (Robin et al., 2014).

En un estudio de determinación de la edad de *T. sagittatus* en el Mediterráneo Occidental, basado en el análisis de la microestructura de estatolitos, el retro-cálculo de la época de eclosión de paralarvas mostró que aunque la eclosión se producía a lo largo del año, este fenómeno era más abundante entre agosto y diciembre (Quetglas, & Morales-Nin, 2004). No obstante, hasta la fecha, la paralarva de esta especie aún no ha sido descrita (Zaragoza et al., 2015).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es describir las características morfológicas, en base a caracteres observados bajo lupa binocular y microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscopy*, SEM), de la paralarva de *T. sagittatus*, obtenida mediante técnicas de fertilización *in vitro*.

3. METODOLOGÍA

3.1. Recolección de ejemplares

Se recolectaron machos y hembras maduros de *T. sagittatus* en la lonja de Vilanova i la Geltrú en octubre y noviembre de 2014, capturados como pesca acompañante por barcos arrastreros a una profundidad de entre 300 y 400 metros. Los ejemplares maduros seleccionados procedieron siempre del último lance de cada barco con el objetivo de que tuvieran el mayor grado de frescura posible. Posteriormente fueron transportados al laboratorio del Institut de Ciències del Mar, Barcelona, dentro de neveras portátiles con hielo picado en su interior, con el fin de mantener su frescura. Durante el transporte se evitó el contacto directo de los ejemplares con el hielo para prevenir que los gametos pudiesen sufrir un choque osmótico por la fusión del hielo elaborado con agua dulce. Una vez en laboratorio, se diseccionaron los individuos para comprobar su frescura y estado de madurez sexual. Se consideró el bombeo activo del sistema circulatorio de los ejemplares como un índice de frescura. Dado que el grado de frescura de las hembras parece estar relacionado con la tasa de fertilización (Villanueva et al., 2011), se seleccionaron las hembras maduras con

latidos discernibles y/o vasos sanguíneos con movimientos peristálticos. Entre estas hembras, se seleccionaron aquellas que mostraron oocitos en los oviductos. Se registró el peso y longitud del manto de cada uno de los ejemplares seleccionados (Tabla 1), mediante una báscula y un ictiómetro, respectivamente. Entre la captura de los ejemplares a bordo y el inicio de la fertilización en laboratorio transcurrieron 3-4 horas.

Previamente a los experimentos exitosos indicados seguidamente, el muestreo en lonja se realizó en 5 ocasiones, sin que se recolectaran ejemplares suficientemente maduros que permitieran la fertilización. Posteriormente se realizaron dos experimentos utilizándose en total cuatro ejemplares, dos hembras y dos machos. Las dos hembras utilizadas presentaban un grado de madurez correspondiente al estadio V-VI según la escala de estadios de madurez sexual del calamar *Illex argentinus* propuesta por Brunetti (1990). Las dos hembras utilizadas presentaban los oviductos llenos de oocitos y glándulas nidamentales de color blanco bien desarrolladas. No obstante, las glándulas nidamentales de la hembra utilizada en el Experimento 2 (ver a continuación), tenían una consistencia menos compacta y más distendida, posiblemente indicando que esta hembra había realizado ya algún desove. Por otro lado, solamente la hembra del Experimento 1 presentaba espermatangios implantados en la región bucal.

Los machos correspondían a un estadio V de acuerdo con la escala de madurez sexual mencionada, ya que mostraban el saco espermático plenamente formado repleto de espermátóforos y el conducto deferente era grueso y de color blanco.

Tabla 1. Datos de talla, peso y condición de las hembras y machos de *Todarodes sagittatus* utilizados en los experimentos de fertilización *in vitro*. Se indica la fuente del esperma utilizado en cada experimento. LDM, longitud dorsal del manto.

Experimento	Hembra				Macho				Fuente de esperma
	LDM (mm)	Peso (g)	Condición	Fecha de captura	LDM (mm)	Peso (g)	Condición	Fecha de captura	
Experimento 1	340	1300	Oviductos llenos, glándulas nidamentales blancas bien desarrolladas	27/10/14	No se disponía de machos, el esperma procede de espermatangios de la hembra.				Espermatangios y receptáculos seminales maternos (Fig. 1C)
Experimento 2	347	1370	Oviductos llenos, glándulas nidamentales de consistencia blanda	19/11/14	233	330	Saco espermático lleno	18/11/14	Espermátóforos del saco espermático + conducto deferente (Fig. 1B)
					243	410	Saco espermático lleno	10/11/14	Espermátóforos del saco espermático + conducto deferente (Fig. 1B)

3.2. Técnicas de fertilización

Los experimentos de fecundación *in vitro* se realizaron siguiendo el protocolo de fertilización *in vitro* de calamares oceánicos descrito por Villanueva et al. (2012) con algunas modificaciones, utilizado rutinariamente por el grupo de investigación. En todos los experimentos, se utilizó agua de mar procedente del circuito abierto de agua de mar del Institut de Ciències del Mar (ICM) situado en la Zona de Acuarios y Cámaras Experimentales (ZAE), que está equipado con un filtro de 20 μm . Esta agua fue filtrada una segunda vez con filtros de 0,2 μm , para reducir la presencia de microorganismos, y almacenada en oscuridad a 4 °C en botellas de vidrio previamente autoclavadas hasta ser utilizada durante los días posteriores. Para reducir el crecimiento bacteriano en el medio de incubación, se añadieron 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ampicilina y estreptomicina al agua de mar filtrada (*Filtered Sea Water*, FSW) obteniendo FSW con antibiótico (FSW + A). Para cada fertilización, todo el material de disección utilizado fue lavado previamente con etanol 96° y todo el material de vidrio se autoclavó antes de su uso. Se utilizaron placas de Petri y pipetas de plástico estériles para manipular los gametos y huevos.

3.2.1. Obtención de gametos

Debido a que *T. sagittatus* no es una de las especies objetivo de pesca y se captura como especie acompañante con una baja presencia en las capturas, el muestreo de ejemplares adultos maduros propicios para la realización de fecundaciones *in vitro* suele ser reducido y poco predecible. Conseguir hembras y machos maduros simultáneamente es, pues, un suceso poco previsible. Por esta razón, y dada la dificultad observada en experimentos anteriores para obtener paralarvas de esta especie mediante fecundación *in vitro*, se realizaron algunas modificaciones al protocolo de fertilización estándar (ver Anexo A.1) para asegurar una fertilización exitosa y un desarrollo adecuado que obtuviera paralarvas de la mejor calidad posible (ver a continuación). Para realizar las fertilizaciones se recurrió a esperma de diferentes fuentes (Tabla 1). En el Experimento 1 se utilizó esperma procedente de receptáculos seminales (estructuras de la membrana bucal de la hembra que almacenan esperma) y de espermatangios, dado que el día en que se capturó la hembra madura no se disponía de ningún macho en la misma pesca. En *T. sagittatus* las hembras copuladas presentan los espermatangios adheridos alrededor de la masa bucal, cerca de donde se sitúan también los receptáculos seminales (Fig. 1C). Cuando en diferentes muestreos se disponía de machos maduros pero no de hembras maduras, se preservaron los espermátóforos del interior del saco espermático y los

conductos deferentes diseccionados en FSW a 4 °C, para utilizarse en una fertilización posterior. En concreto, en el Experimento 2 se utilizó esperma preservado en estas condiciones durante 1 y 9 días. Tras la extracción de la fuente de esperma, ésta se troceó con tijeras en una placa de Petri hasta obtener una masa espermática homogénea, la cual se trasladó a un recipiente de vidrio de 10 ml con FSW + A y se agitó, para promover la activación del esperma. Esta disolución de esperma se filtró a través de una malla de nylon de 150 µm para reducir contaminación orgánica debido a restos pertenecientes a cápsulas de espermátóforos, de espermatangios o de tejidos de la hembra extraídos con los espermatangios o los receptáculos seminales. No obstante, dado que se disponía de poca cantidad de esperma en el Experimento 1, una porción del esperma se utilizó sin filtrar.

Los oocitos se recolectaron diseccionando los oviductos de 2 hembras maduras, lavadas previamente con agua de mar para eliminar el lodo proveniente de la pesca de arrastre. Se depositó una gota de oocitos (unos 200-300 oocitos aproximadamente) en cada placa de Petri estéril.

3.2.2. Mezcla de gametos

Utilizando una pipeta Pasteur estéril, se añadió la disolución de esperma filtrado a los oocitos depositados en la placa de Petri hasta cubrirlos, homogenizando suavemente la mezcla. Sin embargo, en el Experimento 1 los oocitos también se depositaron en una placa de Petri que ya contenía la disolución de esperma no filtrado. Los oocitos permanecieron siempre cubiertos por la disolución de esperma durante 30 minutos.

Transcurrido este periodo, se añadió una disolución de glándula oviductal de *T. sagittatus* a cada placa de Petri hasta alcanzar un total de 12 ml aproximadamente, removiendo suavemente y procurando que los huevos quedasen separados. Esta disolución de glándula oviductal fue preparada previamente a la fertilización adicionando 1 g·l⁻¹ de glándula oviductal liofilizada a FSW + A. La mezcla se agitó enérgicamente hasta conseguir una disolución homogénea y se filtró con malla de nylon de 200 o 300 µm para eliminar restos existentes de oviductal no disuelta. Las glándulas oviductales utilizadas procedían de disecciones previas de hembras maduras. Las glándulas oviductales fueron congeladas a -80 °C y posteriormente liofilizadas y trituradas hasta conseguir un fino polvo. Después de adicionar la disolución de glándula oviductal sobre los huevos, todas las placas de Petri se trasladaron a recipientes de plástico y se introdujeron en incubadoras Memmert MMICP 500 con la temperatura programada para cada experimento, en oscuridad. Los huevos se mantuvieron en esta disolución durante 4 horas, tras lo cual el medio se

sustituyó por FSW + A, intentando eliminar los restos de oviductal para reducir en lo posible la contaminación orgánica. Dada la dificultad en asegurar que los embriones de esta especie desarrollen una expansión coriónica adecuada, se administraron dosis adicionales de disolución de glándula oviductal a una selección de placas de Petri durante los estadios XIV-XV con el objetivo de mejorar su expansión coriónica. Siguiendo el mismo procedimiento anterior, los huevos permanecieron en esta disolución durante 4 horas, tras lo cual se trasladaron a nuevas placas de Petri con FSW + A renovada.

3.3. Selección de los huevos y determinación de la tasa de fertilización

La observación de los huevos y su posterior seguimiento se realizó bajo lupa binocular a 10-160 aumentos. Se determinó la tasa de fertilización de los experimentos realizando contajes del número total de huevos fecundados y oocitos no fecundados en 10-20 placas. Los huevos fecundados se distinguían por tener una forma esférica (frente a la forma más ovoide que presentan los oocitos no fecundados), una expansión coriónica inicial con el micrópilo visible y una proliferación celular en el polo animal (debajo del micrópilo). Los huevos fecundados se trasladaron a nuevas placas de Petri estériles con 12 ml de FSW + A aclimatada a la temperatura experimental, tratando de eliminar al máximo los restos de las disoluciones de esperma y de glándula oviductal, y se devolvieron a la incubadora.

3.4. Incubación de los huevos y determinación de la tasa de supervivencia

Los huevos se incubaron en dos tratamientos a 15 y 17 °C. Esta temperatura trata de ajustarse dentro de las condiciones térmicas del Mar Mediterráneo en la zona mesopelágica (Brasseur et al., 1996), donde se sospecha que pueden ubicarse las masas de huevos. Diariamente durante los experimentos, los oocitos no fecundados y los embriones muertos o con malformaciones no viables para la vida se contaron y descartaron, estimándose la supervivencia de cada experimento. Así mismo FSW + A fue preparada y remplazada diariamente, para evitar contaminaciones y mantener el medio de los huevos limpio y oxigenado durante su desarrollo embrionario. Durante el proceso, se evitaron cambios bruscos de temperatura y que los huevos pudiesen quedar en seco. No obstante, durante los primeros 6 días de desarrollo embrionario el medio (FSW + A) de una selección de placas de Petri del tratamiento de 17 °C del Experimento 2, el agua no se renovó, tiempo durante el cual los embriones no se perturbaron. En ese momento, los embriones viables se trasladaron a nuevas placas de Petri estériles con nueva FSW + A y su medio se renovó diariamente.

3.5. Determinación del estadio de recién nacido

Se realizó un seguimiento diario del desarrollo embrionario de los huevos, utilizando como guías de desarrollo los estadios embrionarios propuestos por Watanabe et al. (1996) para *T. pacificus* y por Sakai et al. (1998) para *I. argentinus*, hasta alcanzar la fase de paralarva con el vitelo casi agotado. En los presentes experimentos, se consideró que los embriones habían alcanzado la fase de paralarva cuando presentaban los siguientes caracteres morfológicos reconocibles bajo lupa: el saco de la tinta desarrollado y lleno, una probóscide extensible y aletas funcionales con una amplitud equivalente a la de la cabeza; características que probablemente ya posibilitan comportamientos natatorios, alimenticios y de evasión.

3.6. Descripción morfológica y patrón de cromatóforos de las paralarvas

Durante los experimentos, se obtuvieron fotografías y vídeos de los huevos y recién nacidos utilizando una lupa Leica MDG41 equipada con una cámara digital para microscopio Leica DFC450, empleando el programa LAS CORE V4.1. Para realizar la descripción morfológica, observar detalles anatómicos, analizar morfométricamente y obtener el patrón de cromatóforos del recién nacido se seleccionaron aleatoriamente y anestesiaron, con gotas de etanol 70% diluidas en el medio de la placa de Petri, individuos identificados en los estadios XXX, XXXII y XXXIV descritos por Watanabe et al. (1996) para *T. pacificus*. Tras la captura de imágenes y vídeos los individuos se sacrificaron, lo cual significó que por ejemplo individuos seleccionados en estadio XXX no continuaron su desarrollo a partir de este punto. La anestesia y en su caso sacrificio de los ejemplares se realizó acorde con procedimientos éticos (Fiorito et al., 2014) recomendados en la actual normativa europea para manejo de animales de experimentación en laboratorio (Directive 2010/63/EU).

La descripción morfométrica se ha basado en las siguientes medidas obtenidas del análisis de imágenes y vídeos, de paralarvas (generalmente bajo anestesia) capturados en visión

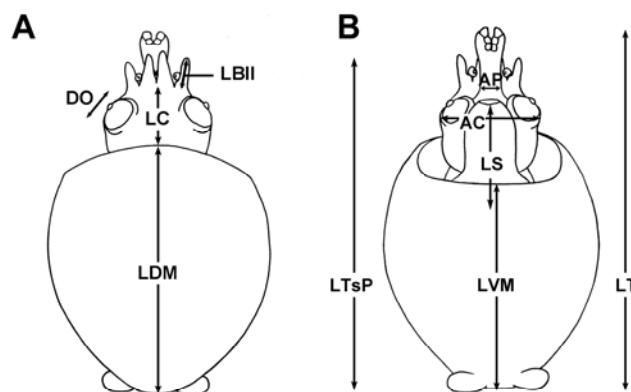


Fig. 4. *Todarodes sagittatus*. Dibujos esquemáticos de las paralarvas en visión (A) dorsal y (B) ventral, ilustrando las medidas realizadas para la descripción morfométrica. (AC, anchura de la cabeza; AP, anchura de la probóscide; DO, diámetro del ojo; LBII, longitud del brazo II; LC, longitud de la cabeza; LDM, longitud dorsal del manto; LS, longitud del sifón; LT, longitud total; LTsP, longitud total sin probóscide; LVM, longitud ventral del manto).

dorsal y ventral: longitud total (LT), longitud total sin probóscide (LTsP), longitud dorsal del manto (LDM), longitud ventral del manto (LVM), longitud del sifón (LS), longitud de la cabeza (LC), anchura de la cabeza (AC), diámetro del ojo (DO), longitud del brazo II (LBII) y anchura de la probóscide (AP) (Fig. 4).

El patrón de cromatóforos se describió a partir de imágenes de las paralarvas en visión dorsal y ventral. La visión lateral no se consideró para la descripción porque los cromatóforos que la componían correspondían a los cromatóforos más laterales de las visiones dorsal y ventral. Para codificar el patrón de cromatóforos, que se disponían formando filas transversales, se numeraron las filas de cromatóforos en orden ascendente en dirección anteroposterior del cuerpo de la paralarva y se contabilizó el número de cromatóforos de cada fila. Por ejemplo, el patrón de cromatóforos ventral del manto 3 + 6 + 3 + 2 representa 3 cromatóforos en el margen anterior del manto, 2 cromatóforos en el extremo distal del manto y 2 filas de cromatóforos en medio con 6 y 3 cromatóforos. La moda de cromatóforos de cada fila se consideró representativa del patrón y se utilizó para realizar dibujos esquemáticos de las 2 visiones de las paralarvas.

3.7. Observación de paralarvas con microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscopy, SEM*)

Las paralarvas seleccionadas para la observación con SEM se anestesiaron con gotas de etanol 70% hasta observar el cese del bombeo de los corazones, con el fin de evitar fenómenos de ballooning (retracción de la cabeza dentro del manto) de las paralarvas en el momento de su fijación en glutaraldehído 4-5% en agua de mar, durante aproximadamente 24 horas. Tras la fijación, las muestras se lavaron en FSW seguido de una deshidratación en una serie de etanol de concentración creciente (20, 30 y 50%) y se almacenaron en etanol 70% a 4 °C. Para preparar las muestras para su observación con SEM, se completó la deshidratación hasta su saturación en etanol absoluto (80, 90 y 100%) y se realizó el secado de punto crítico en una Bal-Tec CPD 030 Drier, utilizando CO₂ como el fluido de transición. Después de la etapa de secado, las muestras se montaron en portamuestras o stubs adhesivos en la orientación deseada y fueron recubiertas con oro-paladio en una Polaron Sputter Coater SC500. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S3500N en el Servicio de Microscopía Electrónica del ICM y se obtuvieron imágenes de paralarvas en los estadios XXXII-XXXIV.

Con SEM se realizó un análisis detallado de la zona bucal, las ventosas y de la superficie de la cabeza y manto. En el análisis de las ventosas se contabilizó el

número de *pegs* (pequeñas estructuras cilíndricas en el interior de las ventosas). Para el recuento de *pegs* de la probóscide se identificó cada ventosa. Cuando la probóscide está cerrada, las 8 ventosas del extremo se observan emparejadas formando 4 filas, la fila 1 es visible dorsalmente y las otras 3, ventralmente. No obstante, se observa otra configuración de las ventosas cuando la probóscide está abierta. En este caso, el par de ventosas de la fila 2 corresponde a las ventosas laterales y las demás ventosas corresponden a las ventosas medias. Todos los ejemplares observados presentaban la probóscide cerrada, por lo tanto los pares de ventosas se numeraron en orden ascendente dorsoventral. También se midió el diámetro de las ventosas de la probóscide y se calculó la ratio entre las ventosas laterales (par 2) y las demás (pares 1, 3 y 4).

3.8. Observaciones sobre el comportamiento de extensión de la probóscide de paralarvas

Se realizaron filmaciones del comportamiento de las paralarvas durante las sesiones de toma de vídeos para la descripción morfológica. Entre otros, se logró registrar fenómenos de extensión y retracción de la probóscide. En dichas observaciones, las paralarvas se encontraban en placas de Petri y en condiciones de anestesia con gotas de etanol 70%. Para caracterizar la extensión de probóscide que realizaban las paralarvas, se exportaron fotogramas de los vídeos correspondientes al momento de extensión, capturados con una velocidad de 8 fotogramas/segundo, y se midió la longitud de la probóscide en el momento de máxima extensión (LPmax), la longitud de la probóscide en reposo (LPrep) y se contabilizó el tiempo (en milisegundos) empleado por la probóscide para alcanzar la extensión máxima medida desde su posición de reposo (tiempo de extensión; TE).

4. RESULTADOS

4.1. Fertilización *in vitro*, supervivencia, incubación y eclosión de los huevos

Se obtuvieron porcentajes de fertilización bajos en el Experimento 1 de fecundación *in vitro* con esperma filtrado (2,5%), pero obteniendo un porcentaje ligeramente superior al utilizar esperma sin filtrar (12,7%) (ver Anexo A.2).

En el Experimento 2, la tasa de fertilización de las fecundaciones con esperma de machos presentó diferencias según el tiempo que éste se mantuvo almacenado en FSW. Se obtuvo una muy baja tasa de fertilización (2,5%) al utilizar esperma del conducto deferente y de espermátóforos del saco espermático refrigerados a 4 °C durante 9 días, de los cuales sólo 12 espermátóforos fueron aprovechables porque

una parte importante experimentó la reacción espermatofórica durante su almacenamiento (ver Anexo A.3).

Ambos experimentos realizados obtuvieron una supervivencia media de $4,1 \pm 2,9\%$. La supervivencia máxima obtenida, observada en la incubación realizada a $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, fue del $8,2\%$ (ver Anexo A.4). El porcentaje de supervivencia para cada temperatura y experimento se indican en Anexo A.4. Se consiguieron un total de 42 paralarvas, a partir de las cuales se realizó la descripción morfológica.

El desarrollo embrionario de los huevos incubados a 15 y $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ duró aproximadamente 18 y 15 días, respectivamente. En ambos tratamientos, los embriones eclosionaron prematuramente durante los estadios de desarrollo XXV-XXVI (Fig 5). Éstos ya presentaban la fisura aún pequeña del vitelo en el ápice posterior de éste, los órganos internos con forma de trífido (Fig. 5B) y los tentáculos se unían sólo por la base, pero todavía no se apreciaban los estatolitos (Fig. 5C) ni los primordios de las aletas (Fig. 5D). Los embriones continuaron su desarrollo en el interior de las placas de Petri sin problemas aparentes causados por esta eclosión prematura.

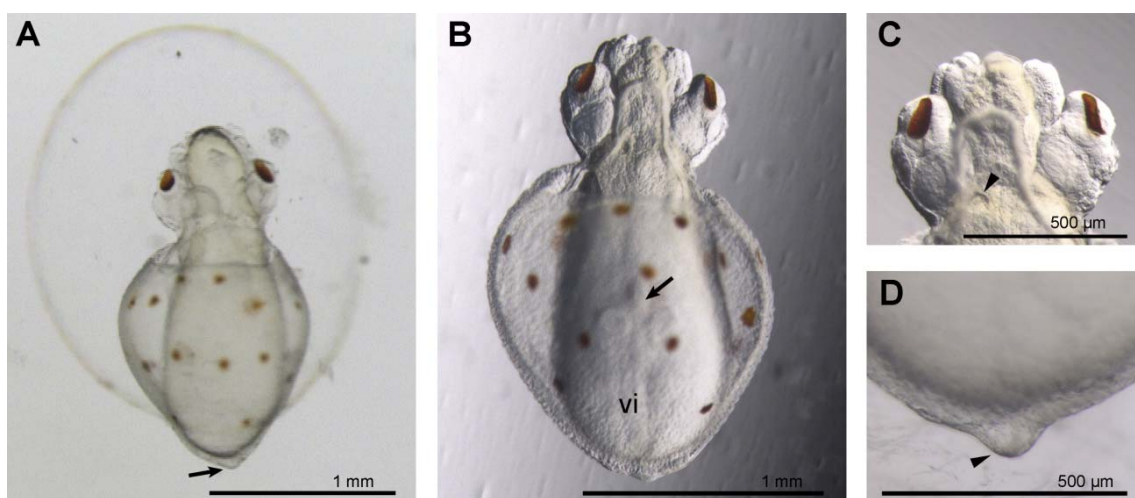


Fig. 5. *Todarodes sagittatus*. Embriones nacidos prematuros durante los estadios de desarrollo XXV-XXVI. (A) Eclosión de un embrión de 138 horas de edad, incubado a $17\text{ }^{\circ}\text{C}$. La flecha señala el órgano de Hoyle. (B) Visión ventral de un embrión de 196 horas de edad, incubado a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La flecha señala los órganos internos con forma de trífido, tales como corazón sistémico, corazones branquiales, branquias, estómago, ciego, recto y papilas anales. (C) Detalle de la cabeza de un embrión de 196 horas de edad, incubado a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La punta de flecha señala los estatocistos todavía sin estatolitos. (D) Detalle del extremo posterior del manto de un embrión de 163 horas, incubado a $17\text{ }^{\circ}\text{C}$. La punta de flecha señala el órgano de Hoyle. (vi, vitelo).

4.2. Descripción de paralarvas recién nacidas

4.2.1. Descripción morfológica general

De acuerdo con los criterios utilizados en este trabajo para la designación del individuo recién nacido de *T. sagittatus* obtenido por fertilización *in vitro* (saco de la tinta

desarrollado y lleno, probóscide extensible y aletas funcionales), éste se correspondería a los estadios de desarrollo XXXII-XXXIV descritos por Watanabe et al. (1996) para *T. pacificus*. Consecuentemente, la descripción morfológica que se presenta a continuación ilustra paralarvas en los estadios XXXII-XXXIV.

4.2.2. Morfología externa

El recién nacido de *T. sagittatus* tiene una cabeza con una forma trapezoidal y márgenes redondeados. En la parte postero-lateral, la cabeza tiene dos grandes ojos ovalados en posición ligeramente dorsal y orientados hacia la región anterior de la cabeza (Fig. 6A).

En este estadio, la corona braquial de las paralarvas está compuesta por los brazos I, II, IV y la probóscide. Dorsalmente, en el margen distal de la cabeza surgen dos pares de brazos, el par de brazos I en el centro y los brazos del par II situados lateralmente a los brazos del par I (Figs. 6A, B). Cada brazo está provisto de una sola ventosa en la superficie ventral (Fig. 6B). La boca se sitúa en la región frontal de la cabeza, entre los brazos, quedando oculta tras los pares de brazos I y II cuando es vista en posición dorsal. Algunos elementos de la boca, como el pico y la rádula, son visibles bajo lupa binocular por transparencia (Fig. 6A). Ventralmente, también alrededor de la boca se sitúa el par de brazos IV (Figs. 6C, 7D), aún con forma de primordios y normalmente oculto por el sifón. La probóscide emerge ventralmente del margen distal de la cabeza. Esta estructura tiene forma de trompa, es más larga que los brazos y está provista de 8 ventosas en el extremo distal, diferentes en tamaño (Figs. 6B, 7D). Las 2 ventosas laterales (o el segundo par de ventosas cuando la probóscide está cerrada) son mayores que las demás, correspondientes a las 6 ventosas medias. La ratio promedio del diámetro de las ventosas laterales frente las ventosas medias es 1,2 ($n = 7$ individuos) (ver Anexo A.5).

En la parte posterior de la cabeza, presentan 2 estatocistos redondos, cada uno con un pequeño estatolito ovalado en el interior.

El manto es globoso, aplanado dorsalmente y convexo ventralmente, y se estrecha posteriormente terminando con el extremo posterior redondeado ligeramente puntiagudo (Fig. 8). El margen anterior del manto es redondeado con un diámetro más ancho que la cabeza y ventralmente con una mayor apertura de manto. El sifón se sitúa ventralmente en el extremo anterior del manto y tiene una forma alargada que prácticamente alcanza la base de los brazos, cubriendo ventralmente la cabeza (Figs. 8B, E, H). El cartílago de cierre del sifón, visible por transparencia, tiene la característica forma de T invertida de los ommastréfidios (Fig. 6D) y aún no está

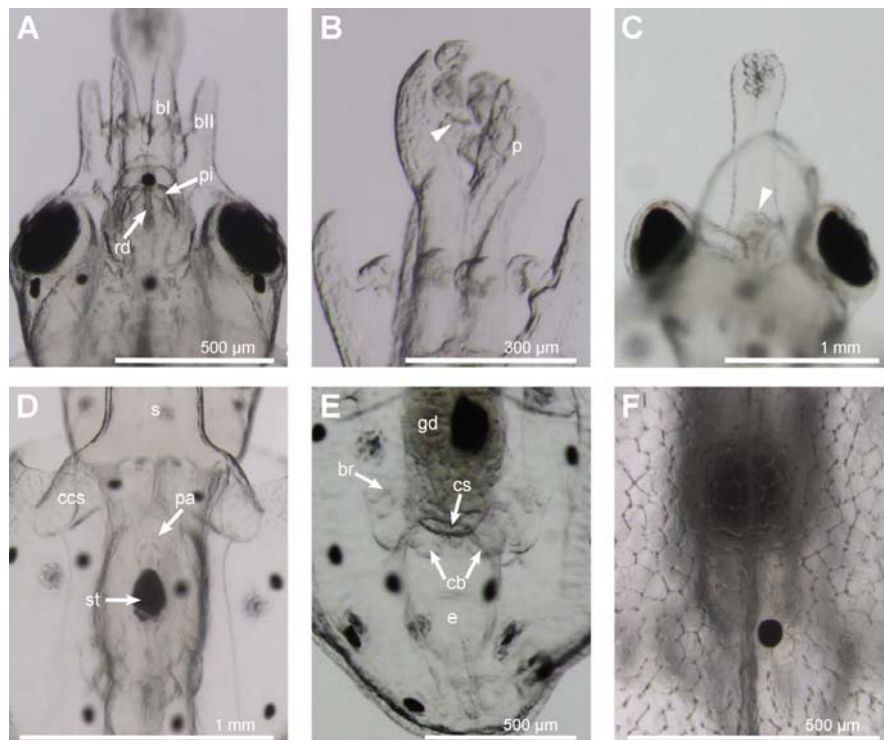


Fig. 6. *Todarodes sagittatus*. Detalles de la morfología externa e interna de paralarvas durante los estadios de desarrollo XXXII-XXXIV, obtenidas mediante fertilización *in vitro*. Ejemplares bajo condiciones de anestesia con etanol 70° que puede provocar la contracción de los cromatóforos. (A) Visión dorsal de la cabeza de un individuo de 358 horas de edad, incubado a 17 °C. (B) Detalle de la probóscide y pares de brazos I y II de un individuo de 426 horas de edad, incubado a 15 °C. La punta de flecha señala los *pegs* de una ventosa de la probóscide. (C) Visión ventral de la cabeza de un individuo de 358 horas de edad, incubado a 17 °C. La punta de flecha señala el par de brazos IV. (D) Visión ventral de la región anterior del manto de un individuo de 362 horas de edad, incubado a 15 °C. (E) Visión ventral de la región posterior del manto de un individuo de 426 horas de edad, incubado a 15 °C. (F) Detalle de la piel de un individuo de 358 horas de edad, incubado a 17 °C. (bl, brazo I; bli, brazo II; br, branquias; cb, corazones branquiales; ccs, cartílago de cierre del sifón; cs, corazón sistémico; e, estómago; gd, glándula digestiva; p, probóscide; pa, papilas anales; pi, pico; rd, rádula; s, sifón; st, saco de la tinta).

fusionado al cartílago del manto. En el extremo posterior, el manto tiene dos aletas que se insertan ligeramente dorsales (Fig. 8). Éstas son delicadas estructuras petaloides aplanadas de pequeño tamaño.

En la piel aparece un patrón de poliedros o celdillas, la mayoría de forma hexagonal, prácticamente constantes en tamaño, que se repite homogéneamente por todo el cuerpo, observado *in vivo* bajo lupa binocular (Fig. 6F). Observaciones de microscopía electrónica demuestran que no es una estructura de la superficie del epitelio.

4.2.3. Morfología interna

El manto de las paralarvas es suficientemente translúcido como para distinguir parte de la morfología interna *in vivo*. En posición dorsal se observa la restante masa de vitelo interno (Figs. 8A, D, G). Ventralmente, en la parte anterior de la masa visceral se distingue la glándula digestiva (Fig. 6E) y el saco de la tinta (Fig. 6D), que se observa como una bola negra en posición ventral con respecto a la glándula digestiva,

reconocible por ser de color grisáceo más fuerte bajo lupa binocular. Ligeramente anterior al saco de la tinta, se perciben las papilas anales rodeando el ano al final del recto (Fig. 6D). Posteriormente a la glándula digestiva se sitúan el aparato respiratorio (Fig. 6E), formado por un par de branquias en las cuales son visibles 3 rudimentarias laminillas branquiales, y el aparato circulatorio, cuya estructura general de los adultos ya es reconocible en la paralarva: un corazón branquial en la base de cada branquia y entre éstos se ubica el corazón sistémico (Fig. 6E). En la parte posterior de la masa visceral, se pueden distinguir el estómago (Fig. 6E) con movimiento peristáltico y el ciego.

4.2.4. Anatomía externa observada con SEM

4.2.4.1. Análisis detallado de la zona bucal

En imágenes frontales de la cabeza, se observa la estructura bucal (Fig. 7F). En la boca, el pico está constituido por dos mandíbulas (Fig. 7G), una mandíbula superior sin denticulos con una depresión en el centro del margen y una mandíbula inferior denticulada, en cuyo interior se visualiza una superficie provista de papilas bucales (Fig. 7G). Rodeando el pico, la boca tiene una membrana bucal circular provista de filamentos bucales (Fig. 7G) de 8-13 μm de longitud. No obstante, esta estructura bucal no es posible observarla en todas las paralarvas analizadas con SEM, ya que algunas presentan únicamente una acumulación de largos cilios en el lugar de la boca (Fig. 7H) y el orificio de la misma permanece cerrado.

4.2.4.2. Análisis detallado de las ventosas

El análisis detallado de las ventosas de los pares de brazos I, II y probóscide, revela en su interior la presencia de pequeñas estructuras cilíndricas que sobresalen de la superficie del infundibulum de las ventosas, denominadas *pegs* (Fig. 7E). Los *pegs* están dispuestos en dos anillos concéntricos y son visibles cuando las ventosas están abiertas. Los brazos I y II tienen cada uno 1 ventosa con 14-19 *pegs* en el anillo externo (media 16 ± 2 ; $n = 7$ individuos) y 9-17 *pegs* en el anillo interno (media 14 ± 2 ; $n = 7$ individuos) (ver Anexo A.6). El número de *pegs* de las ventosas de la probóscide se muestra más variable pero se cuantifican 12-24 *pegs* en el anillo externo (media 18 ± 3 ; $n = 4$ individuos) y 12-22 *pegs* en el anillo interno (media 17 ± 3 ; $n = 4$ individuos) (ver Anexo A.6).

4.2.4.3. Análisis de la superficie de cabeza y manto

La superficie dorsal de la cabeza y brazos presenta formaciones de cilios. Los pares de brazos I y II tienen cilios dispuestos en línea desde el extremo distal continuando

por la cabeza siguiendo el mismo recorrido, reconocidos como líneas epidérmicas (Fig. 7C). La probóscide también tiene abundantes cilios, pero no se evidencian formaciones lineales sino que se reparten por toda la superficie de la estructura. Lateroventralmente en la parte posterior de la cabeza, se visualizan a cada lado un pequeño conjunto de cilios más largos, que constituyen los órganos olfatorios (Fig. 7I).

Se observan abundantes pequeños poros redondos y pequeñas masas de mucus en la superficie dorsal de los pares de brazos I y II y en toda la superficie de la cabeza y probóscide (Figs. 7D, F).

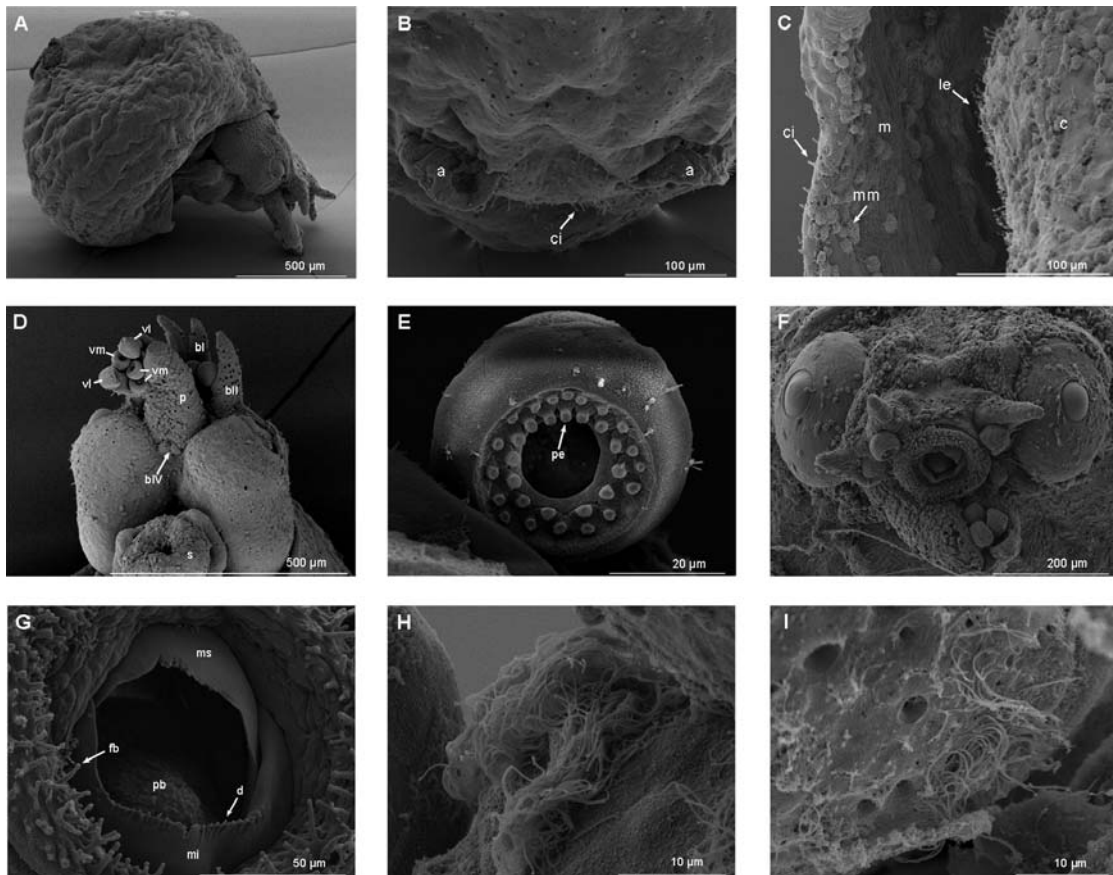


Fig. 7. *Todarodes sagittatus*. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de paralarvas durante el estadio de desarrollo XXXII-XXXIV obtenidas mediante fertilización *in vitro*. (A) Visión lateral de una paralarva de 361 horas de edad, incubada a 17 °C. (B) Detalle del extremo posterior del manto de una paralarva de 365 horas de edad, incubada a 15 °C. (C) Detalle del margen anterior del manto de una paralarva de 365 horas de edad, incubada a 15 °C. (D) Visión ventral de la cabeza de una paralarva de 361 horas de edad, incubada a 17 °C. (E) Detalle de una de las ventosas medias de la probóscide de una paralarva de 361 horas de edad, incubada a 17 °C. (F) Visión frontal de la cabeza de una paralarva de 361 horas de edad, incubada a 17 °C. (G) Detalle de la zona bucal de una paralarva de 361 horas de edad, incubada a 17 °C. (H) Detalle de la acumulación de cilios en el lugar de la boca de una paralarva de 365 horas de edad, incubada a 15 °C. (I) Detalle del órgano olfatorio de una paralarva de 361 horas de edad, incubada a 17 °C. (a, aleta; bl, brazo I; bli, brazo II; bIV, par de brazos IV; c, cabeza; ci, cilios; d, dentículos; fb, filamentos bucales; le, línea epidérmica; m, manto; mi, mandíbula inferior; mm, masa de mucus; ms, mandíbula superior; p, probóscide; pb, papilas bucales; pe, pegs; s, sifón; vm, ventosa media; vl, ventosa lateral).

En el manto, algunas zonas presentan una mayor concentración de cilios sin una ordenación evidente: el sifón, la superficie externa e interna inmediatamente adyacentes al margen anterior del manto (Fig. 7C) y la superficie del extremo posterior del mismo. Entre las aletas, la superficie tiene diversas pequeñas agrupaciones de pocos cilios, con apariencia de gancho (Fig. 7B). A parte de las formaciones de cilios descritas, el cuerpo de las paralarvas tiene cortos cilios dispersos de forma irregular por toda la superficie.

La superficie interna del margen anterior del manto y el sifón presentan un elevado número de pequeñas masas de mucus (Fig. 7C), que son posibles segregaciones del contenido de glándulas de la piel, presentando toda la superficie externa pequeñas masas y poros redondos dispersos.

Por otro lado, en observaciones de SEM no se observa el diseño de hexágonos que se advertía por transparencia en la piel de las paralarvas *in vivo* (Fig. 6F), indicando que éste no pertenece a la capa más externa de la epidermis.

4.2.5. Análisis morfométrico de paralarvas en los estadios XXX, XXXII y XXXIV según la escala propuesta por Watanabe et al. 1996

4.2.5.1. Estadio XXX (Figs. 8A-C; Tabla 2) (n = 15)

Los individuos identificados en el estadio XXX miden en media $2,6 \pm 0,2$ mm de LT y $2,5 \pm 0,2$ mm de LTsP. La LDM y LVM son $1,8 \pm 0,1$ mm y $1,6 \pm 0,1$ mm respectivamente, y la LS es $0,8 \pm 0,1$ mm. La cabeza en este estadio de desarrollo mide en media $0,65 \pm 0,04$ mm en longitud (LC) y $0,75 \pm 0,04$ mm en anchura (AC), y los ojos tienen un diámetro medio de $0,20 \pm 0,04$ mm (DO). El brazo II mide $0,19 \pm 0,03$ mm de longitud (LBII) y la anchura de la probóscide es de $0,17 \pm 0,01$ mm (AP).

4.2.5.2. Estadio XXXII (Figs. 8D-F; Tabla 2) (n = 19)

Los individuos identificados en el estadio XXXII miden en media $2,7 \pm 0,1$ mm LT y $2,5 \pm 0,1$ mm LTsP. La LDM y LVM media son $1,8 \pm 0,1$ mm y $1,7 \pm 0,1$ mm respectivamente, y la LS es $0,8 \pm 0,1$ mm. La cabeza en este estadio de desarrollo mide en media $0,62 \pm 0,07$ mm en longitud (LC) y $0,79 \pm 0,05$ mm en anchura (AC), y los ojos tienen un diámetro medio de $0,24 \pm 0,03$ mm (DO). El brazo II mide $0,20 \pm 0,04$ mm de longitud (LBII) y la anchura de la probóscide es de $0,16 \pm 0,01$ mm (AP).

4.1.1.1. Estadio XXXIV (Figs. 8G-I; Tabla 2) (n = 8)

Los individuos identificados en el estadio XXXIV miden en media $2,6 \pm 0,3$ mm LT y $2,3 \pm 0,3$ mm LTsP. La LDM y LVM media son $1,8 \pm 0,2$ mm y $1,6 \pm 0,2$ mm respectivamente, y la LS es $0,7 \pm 0,1$. La cabeza en este estadio de desarrollo mide en

media $0,59 \pm 0,09$ mm en longitud (LC) y $0,82 \pm 0,11$ mm en anchura (AC), y los ojos tienen un diámetro medio de $0,27 \pm 0,02$ mm (DO). El brazo II mide $0,21 \pm 0,03$ mm de longitud (LBII) y la anchura de la probóscide es de $0,15 \pm 0,01$ mm (AP).

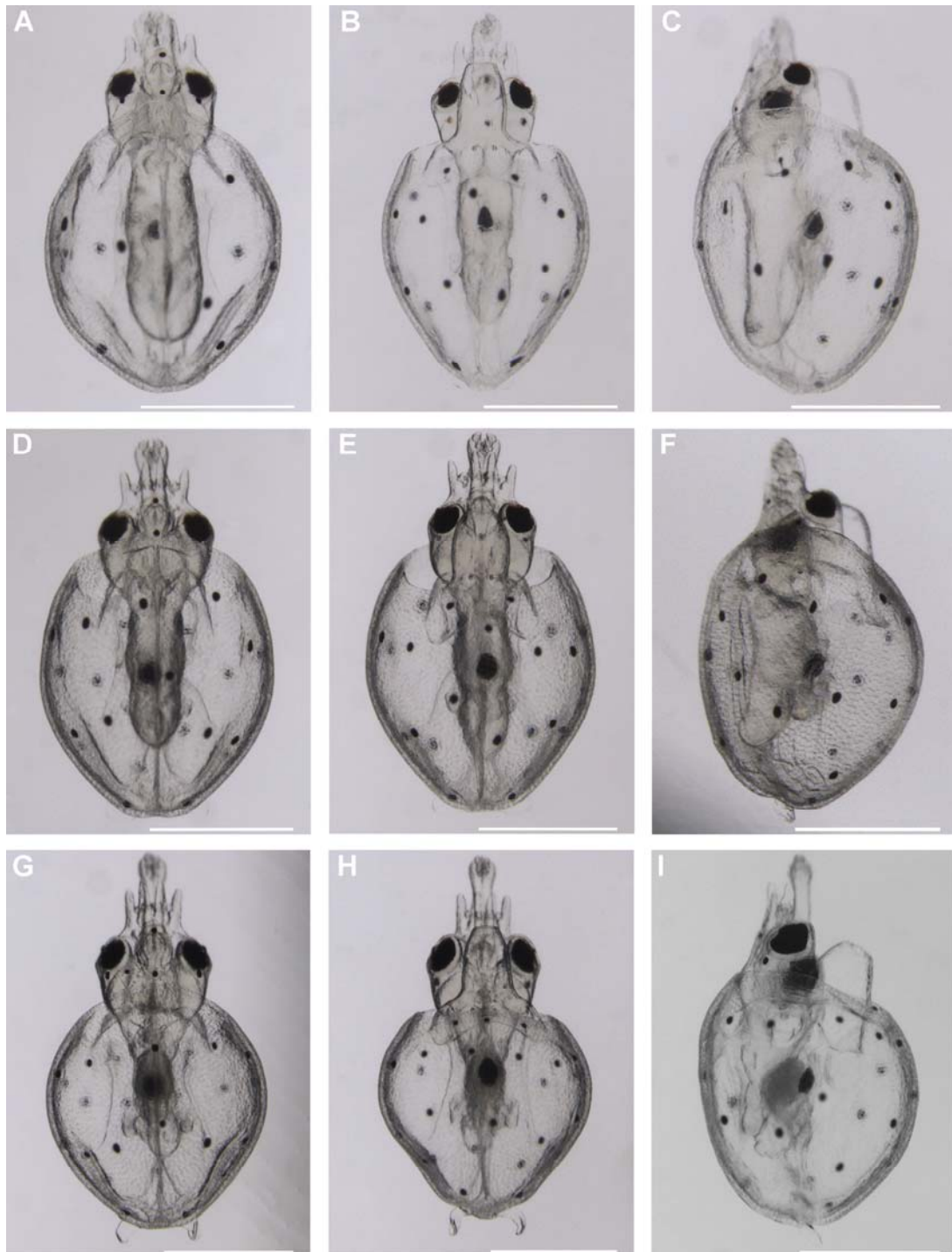


Fig. 8. *Todarodes sagittatus*. Individuos obtenidos mediante fertilización *in vitro*. Ejemplares bajo condiciones de anestesia con etanol 70° que puede provocar la contracción de los cromatóforos. Visión (A) dorsal, (B) ventral y (C) lateral de individuos durante el estadio de desarrollo XXX, de 289 horas de edad, incubados a 17 °C. Visión (D) dorsal, (E) ventral, y (F) lateral de individuos durante el estadio de desarrollo XXXII, de 364 horas de edad, incubados a 15 °C. Visión (G) dorsal, (H) ventral y (I) lateral de individuos durante el estadio de desarrollo XXXIV, de 358 horas de edad, incubados a 17 °C. Escala: 1 mm.

Tabla 2. Medidas morfométricas (en mm) de *Todarodes sagittatus* en estadios XXX (n = 15), XXXII (n = 19) y XXXIV (n = 8). SD, desviación estándar.

	Estadio XXX		Estadio XXXII		Estadio XXXIV	
	Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango	Media ± SD	Rango
LT	2,6 ± 0,2	2,4-2,9	2,7 ± 0,1	2,4-3,0	2,6 ± 0,3	2,0-2,9
LTsP	2,5 ± 0,2	2,2-2,7	2,5 ± 0,1	2,2-2,7	2,3 ± 0,3	1,9-2,6
LDM	1,8 ± 0,1	1,6-1,9	1,8 ± 0,1	1,5-2,0	1,8 ± 0,2	1,4-1,9
LVM	1,6 ± 0,1	1,4-2,0	1,7 ± 0,1	1,5-1,8	1,6 ± 0,2	1,3-1,8
LS	0,8 ± 0,1	0,7-0,9	0,8 ± 0,1	0,6-0,9	0,7 ± 0,1	0,6-0,8
LC	0,65 ± 0,04	0,57-0,72	0,62 ± 0,07	0,49-0,75	0,59 ± 0,09	0,44-0,68
AC	0,75 ± 0,04	0,68-0,79	0,79 ± 0,05	0,70-0,92	0,82 ± 0,11	0,64-0,92
DO	0,20 ± 0,04	0,10-0,24	0,24 ± 0,03	0,16-0,29	0,27 ± 0,02	0,23-0,30
LBII	0,19 ± 0,03	0,11-0,23	0,20 ± 0,04	0,11-0,26	0,21 ± 0,03	0,17-0,26
AP	0,17 ± 0,01	0,15-0,19	0,16 ± 0,01	0,14-0,18	0,15 ± 0,01	0,14-0,16

4.1.2. Descripción del patrón de cromatóforos de paralarvas en los estadios XXX, XXXII y XXXIV

Las paralarvas tienen el cuerpo translúcido y exhiben patrones corporales variables dependiendo de la extensión y contracción de los cromatóforos, controlada por el sistema nervioso. En paralarvas anestesiadas, los cromatóforos están contraídos y se observan como puntos negros redondos. A pesar de la variabilidad individual observada en la disposición de los cromatóforos, se distinguen patrones.

Todas las paralarvas presentan cromatóforos solamente en dos regiones del cuerpo, el manto y la cabeza, asignables sin lugar a dudas como dorsales o ventrales. Por esta razón, en la presente descripción no se ha considerado la presencia de cromatóforos laterales para evitar la duplicidad de caracteres. A continuación se describe el número y patrón más frecuentes de cromatóforos, ilustrado con figuras de las 2 visiones (dorsal y ventral), de las paralarvas en los estadios XXX, XXXII y XXXIV.

4.1.2.1. Estadio XXX (Figs. 9A, B; ver Anexo A.7) (n = 15)

Los ejemplares identificados en estadio XXX solamente presentan cromatóforos en la cabeza en visión dorsal, frecuentemente con ≈4 cromatóforos dispuestos en 2 filas, estando la primera formada por un único cromatóforo central y la segunda por 3 cromatóforos (patrón 1-3). Existe cierta variabilidad en el número y disposición de los cromatóforos del manto. En visión dorsal, el patrón está constituido más frecuentemente por ≈7 cromatóforos dispuestos en 2 filas (patrón 4-3). No obstante, algunos ejemplares presentaban un número mayor de cromatóforos dorsales organizados en hasta 5 filas. Ventralmente, el patrón mayoritario consta de ≈13 cromatóforos dispuestos en 4 filas (patrón 2-4-5-2).

4.1.2.2. Estadio XXXII

(Figs. 9C, D; ver Anexo A.7) (n = 19)

El patrón de cromatóforos de la cabeza es el mismo que el descrito para el estadio XXX. En visión dorsal, el manto muestra un total de ≈ 8 cromatóforos dispuestos en 3 filas (patrón 3-1-4), pudiendo presentar hasta 4 filas, y en visión ventral ≈ 14 cromatóforos dispuestos en 4 filas (patrón 2-6-4-2).

4.1.2.3. Estadio XXXIV

(Figs. 9E, F; ver Anexo A.7) (n = 8)

Los ejemplares identificados en estadio XXXIV también presentan el mismo patrón de cromatóforos en la cabeza dorsalmente que el observado en estadios XXX y XXXII. En el manto, a pesar de la variabilidad observada, el patrón de cromatóforos dorsal presenta ≈ 5 cromatóforos dispuestos en 3 filas (patrón 2-1-2), pudiendo presentar hasta 5 filas, y ≈ 14 cromatóforos ventrales dispuestos en 4 filas (patrón 3-6-3-2).

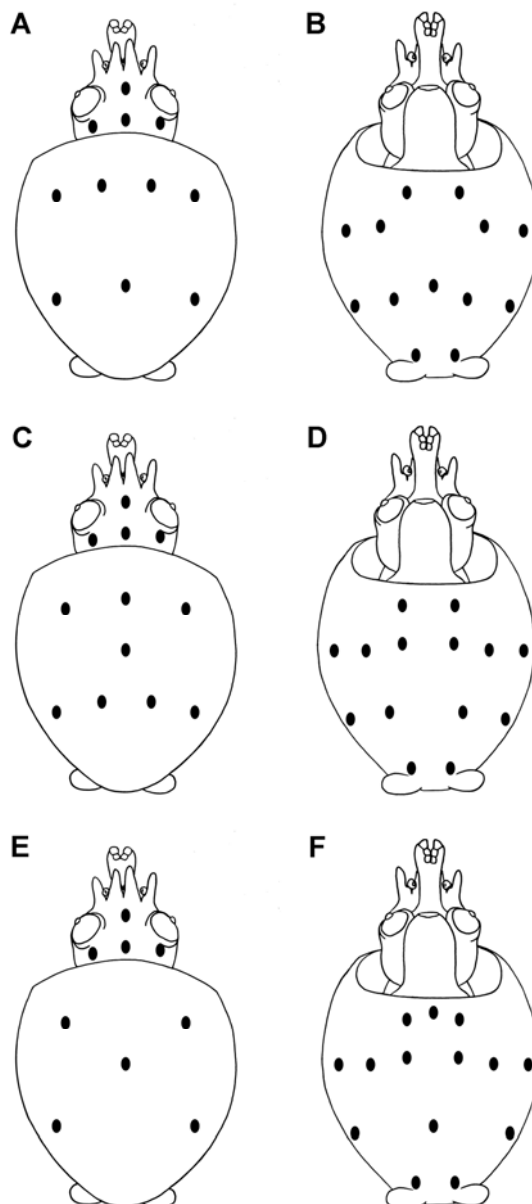


Fig. 9. *Todarodes sagittatus*. Dibujos esquemáticos del patrón de cromatóforos de las paralarvas, realizados a partir de la moda de cromatóforos. Visión (A) dorsal y (B) ventral del estadio de desarrollo XXX. Visión (C) dorsal y (D) ventral del estadio de desarrollo XXXII. Visión (E) dorsal y (F) ventral del estadio de desarrollo XXXIV.

4.2. Observaciones comportamentales

Los individuos recién eclosionados exhibieron una reducida capacidad natatoria, debido en parte al escaso desarrollo de las aletas. El desplazamiento de los ejemplares sobre la superficie de la placa de Petri está aparentemente auxiliado por el movimiento de los cilios que recubren el cuerpo. La natación, basada en el impulso creado por contracciones del manto, denominada propulsión a chorro, mejoró ligeramente con el agotamiento gradual del vitelo interno (y el consecuente aumento

del volumen interno del manto disponible para su llenado de agua), así como por el desarrollo de las aletas. Las paralarvas generalmente nadaban hacia atrás paralelas al fondo de la placa de Petri y a veces mostraron movimientos más complejos y natación vertical.

Se registraron leves movimientos de la probóscide en paralarvas asignadas al estadio XXX pero sólo se observaron comportamientos de

extensión y retracción de la probóscide en paralarvas asignadas a los estadios XXXII-XXXIV (Fig. 10). Durante estas observaciones, en media las paralarvas estiraron la probóscide hasta el $175 \pm 5\%$ de la longitud de la probóscide en reposo en 1599 ± 329 ms ($n = 4$ individuos) (ver Anexo A.8). Después de esta extensión, las paralarvas retrajeron siempre la probóscide a la posición de reposo. La razón de este comportamiento de la probóscide no es conocido.

También con respecto a la corona braquial de las paralarvas, se registró un individuo en estadio XXXIV que se había adherido al fondo de la placa de Petri mediante la ventosa de uno de los brazos, demostrando que éstas ya son funcionales.

5. DISCUSIÓN

En lo que se refiere a las especies de ommastréfidios que habitan en el Mar Mediterráneo, hasta el momento sólo se han obtenido artificialmente paralarvas de *Illex coindetii* (Villanueva et al., 2011) y *Ommastrephes bartramii* (Vijai et al., 2015a; Vijai et al., 2015b), aunque esta última fue descrita para aguas del Océano Pacífico. En este trabajo, las técnicas de fertilización *in vitro* resultaron útiles para obtener y describir la paralarva recién nacida del calamar ommastréfidio *Todarodes sagittatus*.

En los experimentos de fertilización *in vitro* de *T. sagittatus* realizados en este trabajo, la tasa de fertilización conseguida fue considerablemente baja. En particular, el almacenaje de espermátóforos en FSW resultó ser un proceso delicado y problemático debido a la facilidad de estas estructuras para experimentar la reacción espermatóforica. Supuestamente los espermatozoides se activarían al contacto con el agua y ello reduciría su periodo de conservación bajo condiciones de refrigeración, a la espera de ser usados en una posterior fertilización. Esto implicó que pocos

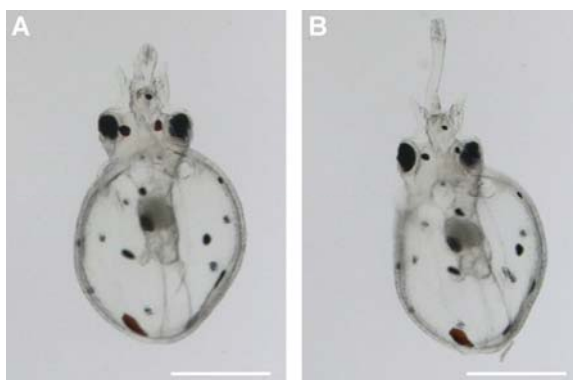


Fig. 10. *Todarodes sagittatus*. Visión dorsal de una paralarva durante el estadio de desarrollo XXXIV, obtenida mediante fertilización *in vitro*, de 358 horas de edad, incubada a 17 °C, con la probóscide (A) en reposo y (B) durante extensión. Barras de escala: 1 mm.

espermátóforos fueran aprovechables, seguramente contribuyendo a la baja tasa de fertilización de la fecundación *in vitro* con esperma refrigerado. A su vez, también se obtuvo una supervivencia generalmente muy baja de los individuos en los experimentos.

En este estudio, todos los individuos eclosionaron durante los estadios XXV-XXVI, coincidiendo con lo observado en individuos fertilizados *in vitro* de *Todarodes pacificus* (Watanabe et al., 1996) y ligeramente antes que individuos de *I. coindetii* (Villanueva et al., 2011), que suelen eclosionar en estadio XXVII. Durante los estadios XXV-XXVI, los recién nacidos se consideran supuestamente prematuros principalmente porque no presentan los estatolitos, ni los primordios de las aletas. La ausencia de estos caracteres impide la capacidad de una natación normal. En particular los estatocistos y estatolitos forman parte del sistema mecanorreceptor de cefalópodos, un sistema esencial para el control oculomotor y del equilibrio y para la capacidad natatoria (Villanueva et al., 2011). Este tipo de eclosión prematura parece ser un fenómeno común en calamares oceánicos fertilizados *in vitro* y posiblemente refleja la diferencia entre las condiciones subóptimas *in vitro* y las de la fertilización natural (Villanueva et al., 2011).

En *Illex argentinus*, se considera que el estadio normal de eclosión corresponde al estadio XXX (Sakai et al., 1998), definiendo el recién nacido con las características de este estadio. Por otro lado, Watanabe et al. (1996) consideró el estadio XXVIII como el momento de eclosión de *T. pacificus* por observar que la eclosión en una masa de huevos inducida en acuario ocurría durante este estadio. Sin embargo, durante este estadio los individuos de *T. pacificus* están menos desarrollados que los de *I. argentinus* en estadio XXX (Sakai et al., 1998).

Para *T. sagittatus*, en el presente trabajo se examinaron los estadios XXX, XXXII y XXXIV (Watanabe et al., 1996) para poder asignar el recién nacido de esta especie a un momento del desarrollo más en concordancia con las características esperadas, más comúnmente aceptadas, de un recién nacido *rhynchoteuthion* en la naturaleza. Generalmente, el recién nacido *rhynchoteuthion* se ha definido por tener el saco de la tinta desarrollado y lleno, probóscide extensible y aletas funcionales con una amplitud equivalente a la de la cabeza (Villanueva et al., 2011), características presentes en *T. sagittatus* sólo a partir del estadio XXXII. Esta observación señala que existen diferencias en el desarrollo de los géneros *Illex* y *Todarodes*, al menos durante las últimas fases, lo cual implica que los últimos estadios embrionarios de *Illex* y *Todarodes* no son equivalentes entre sí. Por esta razón, el recién nacido de *T. sagittatus*, equivalente al estadio XXX de Sakai et al. (1998) para *Illex*, debería

corresponder al estadio XXXII ya que en estadios anteriores las paralarvas carecerían de características esenciales de comportamientos natatorios, alimenticios y de evasión. Por esas razones, la descripción presentada se ha basado en paralarvas del estadio XXXII-XXXIV.

En general, el desarrollo embrionario observado en *T. sagittatus* se ajustó al de *T. pacificus* descrito por Watanabe et al. (1996). Los primordios de las aletas aparecieron más tarde en el desarrollo de *T. sagittatus*, en comparación con *I. argentinus*, siendo todavía pequeñas al alcanzar el estadio de paralarva. Dado que las aletas de las paralarvas de ommastréfidos son relativamente cortas, todavía tienen una función limitada en la natación y el modo de locomoción es realizado principalmente por propulsión a chorro, basado en contracciones frecuentes y rápidas del manto (Robin et al., 2014; Vijai et al., 2015b). Además, las paralarvas también han de operar en números de Reynolds bajos, donde las fuerzas viscosas dominan sobre la inercia. A pesar de eclosionar con tamaños pequeños y en una fase anterior del desarrollo que otros calamares, los ommastréfidos comienzan a nadar activamente enseguida y se ha revelado que tienen una baja eficiencia de propulsión (Staaf et al., 2014).

In vivo los recién nacidos de *T. sagittatus* medían una LVM similar a la observada en *I. coindetii* en las mismas condiciones de incubación, $1,7 \pm 0,1$ mm y $1,6 \pm 0,1$ mm (Villanueva et al., 2011), respectivamente. Todos presentaban todavía una masa de vitelo interno, que seguían consumiendo hasta su absorción completa. Este tipo de alimentación endógena es el que sustenta el metabolismo y actividad normales (Robin et al., 2014). Por otra parte, el movimiento peristáltico del estómago ya presente en nuestros recién nacidos evidencia la diferenciación de los órganos digestivos, un factor que probablemente ya permitiría la transición de las paralarvas de una alimentación endógena a una exógena. Acerca de su alimentación, se ha sugerido que los recién nacidos de ommastréfidos no son depredadores activos sino que se nutrirían de partículas y materia orgánica disuelta durante el período crítico de transición del vitelo a la depredación normal (O'Dor et al., 1985). En cuanto a su dieta inicial, también se ha propuesto que el mucus que presentan estas paralarvas en la superficie, enriquecido en microorganismos, podría formar parte de su dieta y que la probóscide podría desempeñar un papel recolector para la ingestión de éste (Vidal, & Haimovici, 1998). La boca de las paralarvas coincidía con la observada en otras *rhynchoteuthions*, cuya peculiar morfología sugiere una alimentación inicial diferente de la de otros cefalópodos. En concreto, los filamentos bucales rodeando la boca podrían representar una adaptación para la manipulación e ingesta de pequeñas partículas o pequeños fragmentos de mucus enriquecido (Vidal, & Haimovici, 1998).

Como en otras paralarvas de cefalópodos, la mandíbula inferior del pico tenía dentículos, cuya función generalmente se vincula a la ingesta rápida de presas planctónicas (Robin et al., 2014). La boca no se pudo observar en todos los individuos examinados a SEM, posiblemente indicando que la formación completa de la masa bucal tiene lugar durante los estadios paralarvarios. Por otro lado, se podría especular que el pequeño cúmulo de cilios observado en el lugar de la boca de algunos individuos correspondiese al remanente de lo que Shigeno et al. (2001) describen como *scatter-type cilia* (en la superficie de la masa externa de vitelo) en estadios anteriores de *T. pacificus*. También coincidiendo con *T. pacificus* (Watanabe et al., 1996), las branquias se desarrollaron muy tarde y lentamente. En paralarvas de estadio XXXIV sólo se contaban 3 laminillas branquiales. En suma, los órganos digestivos y respiratorios parecen tener un desarrollo especial que caracteriza los estadios paralarvarios de *Todarodes* (Watanabe et al., 1996).

De manera general, el pequeño tamaño del recién nacido de *T. sagittatus* y la diferenciación tardía de algunos órganos podría reflejar una estrategia reproductora para la dispersión de las paralarvas. Observaciones en laboratorio han mostrado que paralarvas recién nacidas de *T. pacificus* ascienden a la superficie poco después de eclosionar (Yoo et al., 2014). Al permanecer cerca de la superficie, es más probable que sean transportadas por corrientes hacia áreas de alimentación (Yoo et al., 2014). Con todo, también es probable que todos los recién nacidos de cefalópodos experimentan alguna dispersión pasiva debido a corrientes oceánicas, independientemente de su comportamiento específico (Boletzky, 2003; Roberts, & van der Berg, 2005; Martins et al., 2014). Por otro lado, las líneas epidérmicas, análogas a la línea lateral de peces y los cilios en la superficie del cuerpo de *T. sagittatus* también son similares a los de *T. pacificus* (Shigeno et al., 2001) y esta abundancia de cilios en las paralarvas remarca la importancia de la información mecano- y quimiosensorial durante este período.

Por lo que se refiere a la extensión de la probóscide, ésta sólo se ha cuantificado en otra especie, *Dosidicus gigas*, en condiciones ligeramente distintas a las de este trabajo. Staaf et al. (2008) mostraron que la probóscide de *D. gigas* se extendía hasta el $252 \pm 38\%$ de su longitud original en 375 ± 77 ms. En comparación, la extensión en este trabajo ($175 \pm 5\%$ en 1599 ± 329 ms) es menor y más lenta. Es posible que esta diferencia también se deba a que, para la obtención de este dato, nuestras paralarvas estaban en placas de Petri y ligeramente anestesiadas.

Si bien la paralarva de los ommastréfidios es fácilmente reconocible entre todas las familias de cefalópodos por tener una singular estructura (la probóscide), se conocen

pocos caracteres morfológicos que puedan ser útiles en la identificación de paralarvas *rhynchoteuthion* entre especies (Wormuth et al., 1992). Aunque nuestras observaciones se basan en un número limitado de paralarvas obtenidas artificialmente, algunos caracteres morfológicos descritos han resultado ser potencialmente útiles para diferenciar paralarvas recién nacidas de *T. sagittatus*.

A medida que las paralarvas crecen, se van formando más ventosas en los brazos. Sin embargo, el número de ventosas de la probóscide se mantiene constante hasta la división de ésta en los dos tentáculos. Basándose en el diámetro relativo de las ventosas de la probóscide, las *rhynchoteuthion* se pueden clasificar en 3 grupos; *Rhynchoteuthion* A, B y C. Roper & Lu (1979) definieron las *Rhynchoteuthion* A por tener 2 ventosas laterales mayores con 2 o 3 veces el diámetro de las demás ventosas, las *Rhynchoteuthion* B con las 2 ventosas laterales ligeramente mayores sin llegar a duplicar a las ventosas mediales en diámetro, y las *Rhynchoteuthion* C con las 8 ventosas de la probóscide pequeñas de igual tamaño. Los recién nacidos de *T. sagittatus* presentan las 2 ventosas laterales del extremo de la probóscide ligeramente mayores que las restantes 6 ventosas con una ratio de 1,2:1 clasificándolos como *Rhynchoteuthion* de tipo B. Esto coincide con lo observable en la especie congénere *T. pacificus*, ya que en Shigeno et al. (2001) se distingue que en esta especie las ventosas laterales también son mayores que las demás. En cambio, *I. coindetii* se clasifica como *Rhynchoteuthion* de tipo C y *O. bartramii* como *Rhynchoteuthion* de tipo A.

Los *pegs* de las ventosas, estructuras que posiblemente proporcionan fricción y ayudan en la capacidad de adhesión de las ventosas (Nixon, & Dilly, 1977), en la actualidad se han descrito en muy pocas paralarvas de ommatréfid. No obstante, un estudio con *D. gigas* demuestra que el número de *pegs* de las 8 ventosas de la probóscide permanece estable durante el desarrollo de la paralarva (Ramos-Castillejos et al., 2010). Esto significa que, de ser diferente interespecíficamente, el número de *pegs* de la probóscide podría ser un buen carácter taxonómico, dado que se mantiene constante durante toda la fase de paralarva. En *T. sagittatus*, las ventosas de la probóscide presentan 12-24 *pegs* en el anillo externo y 12-22 *pegs* en el anillo interno.

Otro carácter utilizado a menudo en la identificación de paralarvas es el patrón de cromatóforos, principalmente para identificar paralarvas en buenas condiciones morfológicas o paralarvas *in vivo*. En los individuos de *T. sagittatus* el patrón de cromatóforos se mostró algo variable pero conspicuo. Así mismo, aunque se observe que la moda del número de cromatóforos dorsales del manto es menor en individuos del estadio XXXIV, se considera que aquí está reflejando la variabilidad individual en

lugar de una reducción ontogénica del número de cromatóforos. En la región de la cabeza el patrón fue más constante que en el manto. Todas las paralarvas de ommastréfidios descritas hasta ahora tienen cromatóforos dorsales y ventrales en la cabeza a excepción de *T. sagittatus*, únicamente con cromatóforos dorsales. Este carácter sugiere que esta ausencia de cromatóforos en la superficie ventral de la cabeza es útil para distinguir *T. sagittatus* de otras *rhynchoteuthion*.

6. CONCLUSIÓN

Este estudio ha proporcionado la primera descripción morfológica de la paralarva *rhynchoteuthion* de *Todarodes sagittatus*. Se han comparado los últimos estadios embrionarios, identificando el estadio XXXII del desarrollo como el recién nacido de esta especie de acuerdo con las características más comúnmente aceptadas de un recién nacido *rhynchoteuthion* en la naturaleza. En concreto, se ha proporcionado una descripción detallada de la morfología donde también se han identificado algunos caracteres que podrían ser útiles para discriminar esta especie de otras *rhynchoteuthion* del Mediterráneo y Atlántico nororiental. Si bien una identificación apropiada de las paralarvas se basará en una combinación de caracteres morfológicos, la estructura de las ventosas de la probóscide parece ser una estructura taxonómica potencialmente muy útil para esta tarea. Por otra parte, también se han aportado observaciones comportamentales de los recién nacidos en condiciones de laboratorio. Finalmente, se han proporcionado datos de tasas de fertilización utilizando esperma procedente de espermátóforos frescos y almacenados bajo refrigeración, así como de espermatangios para la fertilización *in vitro* de esta especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

Boletzky, S. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in Marine Biology* 44: 143-203.

Bower, J.R. & Sakurai, Y. (1996). Laboratory observations on *Todarodes pacificus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) egg masses. *American Malacological Bulletin* 13(1/2): 65-71.

Brasseur, P.; Beckers, J.M.; Brankart J.M. & Schoenauen, R. (1996). Seasonal temperature and salinity fields in the Mediterranean Sea: Climatological analyses of a historical data set. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* 43(2): 159-192.

Brunetti, N.E. (1990). Escala para la identificación de estadios de madurez sexual del calamar (*Illex argentinus*). *Frente marítimo* 7: 45-51.

FAO. (2014). *FAO Yearbook 2012. Fishery and aquaculture statistics*. Rome.

Fiorito, G.; Affuso, A.; Anderson, D.B.; Basil, J.; Bonnaud, L.; Botta, G.; Cole, A.; D'Angelo, L.; De Girolamo, P.; Dennison, N.; Dickel, L.; Di Cosmo, A.; Di Cristo, C.; Gestal, C.; Fonseca, R.; Grasso, F.; Kristiansen, T.; Kuba, M.; Maffucci, F.; Mancio, A.; Mark, F.C.; Melillo, D.; Osorio, D.; Palumbo, A.; Perkins, K.; Ponte, G.; Raspa, M.; Shashar, N.; Smith, J.; Smith, D.; Sykes, A.; Villanueva, R.; Tublitz, N.; Zullo, L. & Andrews, P. (2014). Cephalopods in neuroscience: regulations, research and the 3Rs. *Invertebrate Neuroscience* 14(1): 13-36.

Ikeda, Y.; Sakurai, Y. & Shimazaki, K. (1993). Fertilizing capacity of squid (*Todarodes pacificus*) spermatozoa collected from various sperm storage sites, with special reference to the role of gelatinous substance from oviducal gland in fertilization and embryonic development. *Invertebrate Reproduction & Development* 23(1): 39-44.

Laptikhovskiy, V. (2013). *Todarodes sagittatus*, European Flying Squid. En: Rosa, R.; Pierce, G. & O'Dor, R. (eds.) *Advances in squid biology, ecology and fisheries. Part II, Oegopsid squids*. New York: Nova Publishers. pp. 223–248.

Laptikhovskiy, V.V. & Murzov, S.A. (1990). A catch of the epipelagic egg mass of the squid *Sthenoteuthis pteropus* in Eastern Tropical Atlantic. *Biologiya Morya* 3: 62-63.

Jereb, P. & Roper, C.F.E. (2010). *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome.

Marian, J.E.A.R. (2015). Evolution of spermatophore transfer mechanisms in cephalopods. *Journal of Natural History* 49(21-24): 1423-1455.

- Martins, R.S.; Roberts, M.J.; Lett, C.; Chang, N.; Moloney, C.L.; Camargo, M.G. & Vidal, E.A.G. (2014). Modelling transport of chokka squid (*Loligo reynaudii*) paralarvae off South Africa: reviewing, testing and extending the 'Westward Transport Hypothesis'. *Fisheries Oceanography* 23(2): 116-131.
- Nixon, M. & Dilly, P.N. (1977). Sucker surfaces and prey capture. *Symposia of the Zoological Society of London* 38: 447-511.
- O'Dor, R.K. & Balch, N. (1985). Properties of *Illex illecebrosus* egg masses potentially influencing larval oceanographic distribution. *Northwest Atlantic Fisheries Organization Scientific Council Studies* 9: 69-76.
- O'Dor, R.K.; Helm, P. & Balch, N. (1985). Can rhyngoteuthions suspension feed? (Mollusca: Cephalopoda). *Vie et Milieu* 35(3/4): 267-271.
- O'Shea, S.; Bolstad, K.S. & Ritchie, P.A. (2004). First records of egg masses of *Nototodarus gouldi* McCoy, 1888 (Mollusca: Cephalopoda: Ommastrephidae), with comments on egg-mass susceptibility to damage by fisheries trawl. *New Zealand Journal of Zoology* 31: 161-166.
- Quetglas, A.; Alemany, F.; Carbonell, A.; Merella, P. & Sánchez, P. (1998). Some aspects of the biology of *Todarodes sagittatus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Balearic Sea (Western Mediterranean). *Scientia Marina* 62: 73–82.
- Quetglas, A. & Morales-Nin, B. (2004). Age and growth of the ommastrephid squid *Todarodes sagittatus* from the western Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84: 421–426.
- Ramos-Castillejos, J.E.; Salinas-Zavala, C.A.; Camarillo-Coop, S. & Enríquez-Paredes, L.M. (2010). Paralarvae of the jumbo squid, *Dosidicus gigas*. *Invertebrate Biology* 129(2): 172-183.
- Roberts, M. J. & van der Berg, M. (2005). Currents along the Tsitsikamma coast, South Africa, and potential transport of squid paralarvae and ichthyoplankton. *African Journal of Marine Science* 27: 375-388.
- Robin, J.; Roberts, M.; Zeidberg, L.; Bloor, I.; Rodriguez, A.; Briceño, F.; Downey, N.; Mascaró, M.; Navarro, M.; Guerra, A.; Hofmeister, J.; Barcellos, D.D.; Lourenço, S.A.P.; Roper, C.F.E.; Moltschaniwskyj, N.A.; Green, C.P. & Mather, J. (2014). Transitions during cephalopod life history: the role of habitat, environment, functional morphology and behaviour. *Advances in Marine Biology* 67: 361–437.
- Rocha, F.; Guerra, A. & González, A.F. (2001). A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Reviews* 76: 291-304.

- Romeo, T.; Battaglia, P.; Pedà, C.; Perzia, P.; Consoli, P.; Esposito, V. & Andaloro, F. (2012). Pelagic cephalopods of the central Mediterranean Sea determined by the analysis of the stomach content of large fish predators. *Helgoland Marine Research* 66(3): 295-306.
- Roper, C.F.E. & Lu, C.C. (1979). Rhynchoteuthion larvae of Ommastrephid squid of the western North Atlantic with the first description of larvae and juveniles of *Illex illecebrosus*. *Proceedings of The Biological Society of Washington* 91(4): 1039-1059.
- Rosas-Luis, R.; Villanueva, R. & Sánchez, P. (2014). Trophic habitats of the Ommastrephid squid *Illex coindetii* and *Todarodes sagittatus* in the northwestern Mediterranean Sea. *Fisheries Research* 152: 21-28.
- Sakai, M.; Brunetti, N.E., Elena, B. & Sakurai, Y. (1998). Embryonic development and hatchlings of *Illex argentinus* derived from artificial fertilization. *South African Journal of Marine Science* 20(1): 255-265.
- Sakurai, Y.; Bower, J.R. & Ikeda, Y. (2003). Reproductive characteristics of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*. En: Kjesbu, O.S.; Hunter, J.R. & Witthames, P.R. (eds.) *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm- and Cold-Water Fish and Squids*. Fisker og Havet. No. 12. Bergen. pp. 105-116.
- Shea, E.K. (2005). Ontogeny of the fused tentacles in three species of ommastrephid squids (Cephalopoda, Ommastrephidae). *Invertebrate Biology* 124(1): 25-38.
- Shigeno, S.; Kidokoro, H.; Tsuchiya, K. & Segawa, S. (2001). Early ontogeny of the Japanese common squid *Todarodes pacificus* (Cephalopoda, Oegopsida) with special reference to its characteristic morphology and ecological significance. *Zoological Science* 18: 1011–1026.
- Staaf, D.J.; Camarillo-Coop, S.; Haddock, S.H.D.; Nyack, A.C.; Payne, J.; Salinas-Zavala, C. A.; Seibel, B.A.; Trueblood, L.; Chadwidmer, C. & Gilly, W.F. (2008). Natural egg mass deposition by the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California and characteristics of hatchlings and paralarvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88: 759–770.
- Staaf, D.J.; Gilly, W.F. & Denny, M.W. (2014). Aperture effects in squid jet propulsion. *The Journal of Experimental Biology* 217: 1588-1600.
- Vidal, E.A.G. & Haimovici, M. (1998). Feeding and the possible role of the proboscis and mucus cover in the ingestion of microorganisms by rhynchoteuthion paralarvae (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Bulletin of Marine Science* 63: 306–316.
- Vijai, D.; Sakai, M. & Sakurai, Y. (2015a). Embryonic and paralarval development following artificial fertilization in the neon flying squid *Ommastrephes bartramii*.

Zoomorphology <http://dx.doi.org/10.1007/s00435-015-0267-6>.

Vijai, D.; Sakai, M.; Wakabayashi, T.; Yoo, H.; Kato, Y. & Sakurai, Y. (2015b). Effects of temperature on embryonic development and paralarval behaviour of the neon flying squid *Ommastrephes bartramii*. Marine Ecology Progress Series 529: 145-158.

Villanueva, R.; Quintana, D.; Petroni, G. & Bozzano, A. (2011). Factors influencing the embryonic development and hatchling size of the oceanic squid *Illex coindetii* following *in vitro* fertilization. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 407: 54–62.

Villanueva, R.; Staaf, D.J.; Argüelles, J.; Bozzano, A.; Camarillo-Coop, S.; Nigmatullin, C.M.; Petroni, G.; Quintana, D.; Sakai, M.; Sakurai, Y.; Salinas-Zavala, C.A.; Silva-Dávila, R.; Tafur, R.; Yamashiro, C. & Vidal, E.A.G. (2012). A laboratory guide to *in vitro* fertilization of oceanic squids. Aquaculture 342–343: 125–133.

Watanabe, K.; Sakurai, Y.; Segawa, S. & Okutani, T. (1996). Development of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*, from fertilized egg to rhynchoteuthion paralarva. American Malacological Bulletin 13: 73–88.

Wormuth, J.H.; O'Dor, R.K.; Balch, N.; Dunning, M.C.; Forch, E.C.; Harman, R.P. & Rowell, T.W. (1992). Family Ommastrephidae Steenstrup, 1857. En: Sweeney, M.J.; Roper, C.F.E.; Mangold, K.M.; Clarke, M.R. & Boletzky, S. (eds.) "Larval" and juvenile cephalopods: A manual for their identification. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp. 105-119.

Yoo, H.; Yamamoto, J.; Saito, T. & Sakurai, Y. (2014). Laboratory observations on the vertical swimming behaviour of Japanese common squid *Todarodes pacificus* paralarvae as they ascend into warm surface waters. Fisheries Science 80: 925-932.

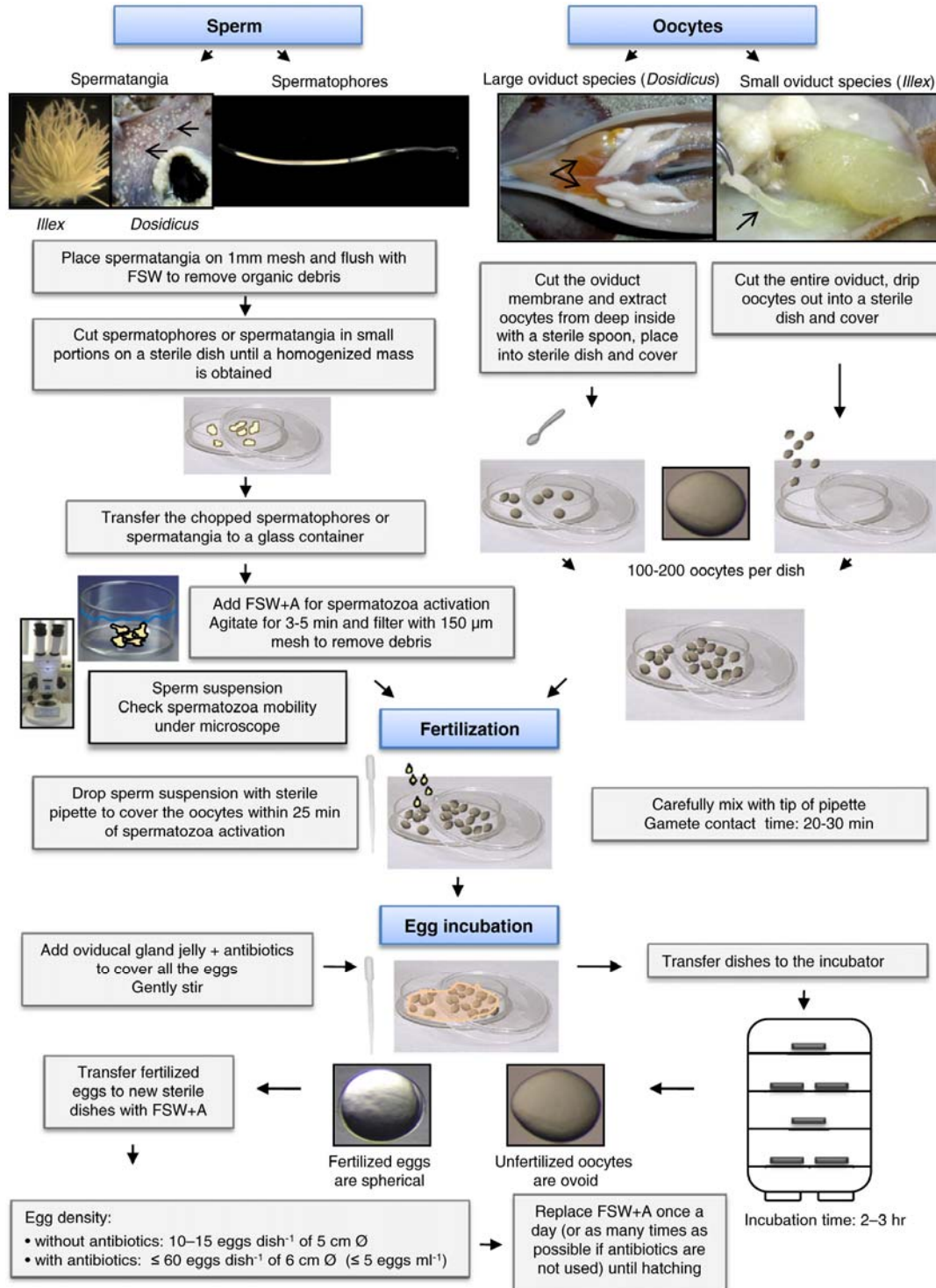
Young, R.E. & Harman, R.F. (1988). "Larva", "paralarva" and "subadult" in cephalopod terminology. Malacologia 29(1): 201-207.

Young, J.W.; Olson, R.J. & Rodhouse, P.G.K. (2013). The role of squids in pelagic ecosystems: An overview. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 95: 3-6.

Zaragoza, N.; Quetglas, A. & Moreno, A. (2015). Identification guide for cephalopod paralarvae from the Mediterranean Sea. ICES Cooperative Research Report No. 324. Copenhagen.

8. ANEXO

A.1. Representación esquemática del protocolo para la recolección de los gametos, fertilización *in vitro* e incubación de los huevos de calamares oceánicos. FSW, *filtered sea water*; FSW + A, *filtered sea water* con antibiótico. (extraído de Villanueva et al., 2012).



A.2. Experimento 1, *Todarodes sagittatus*. Tasa de fertilización (%) del esperma filtrado y sin filtrar de espermatangios y receptáculos seminales. Se indica el número inicial de huevos.

	Huevos (n)	Fertilización (%)
Esperma filtrado	1750	2,5
Esperma no filtrado	405	12,7

A.3. Experimento 2, *Todarodes sagittatus*. Tasa de fertilización (%) del esperma de 2 machos según el número de días almacenado bajo refrigeración a 4 °C. Se indica el número de huevos iniciales.

	Preservación (días)	origen del esperma	Huevos (n)	Fertilización (%)
Macho 1	1	≈ 100 espermatozoides + conducto deferente	1191	26
Macho 2	9	12 espermatozoides + conducto deferente	1112	2,5

A.4. Datos de supervivencia (%) de paralarvas de *Todarodes sagittatus* de experimentos de fertilización *in vitro* incubadas a 15 y 17 °C. Se indica el número inicial de embriones y el número final de paralarvas de cada experimento.

	Temperatura (°C)	Embriones (n)	Paralarvas (n)	Supervivencia (%)
Experimento 1	15	128	3	2,3
Experimento 2	15	978	16	1,6
	17	282	23	8,2

A.5. Diámetro (µm) de las ventosas de la probóscide de paralarvas de *Todarodes sagittatus* (n = 7 individuos). SD, desviación estándar.

	Media ± SD	Rango
Ventosas laterales	41,2 ± 8,0	24,3-51,3
Ventosas medias	35,0 ± 6,7	24,6-44,2
Ratio	1,2	

A.6. Recuento de *pegs* de los anillos externos e internos de las ventosas de los brazos (n = 7 individuos) y de la probóscide (n = 4 individuos) de paralarvas de *Todarodes sagittatus*. SD, desviación estándar.

	Media ± SD	Rango
Brazos I y II	Anillo externo	16 ± 2
	Anillo interno	14 ± 2
	Total	30 ± 3
Probóscide	Anillo externo	18 ± 3
	Anillo interno	17 ± 3
	Total	35 ± 5

A.7. Número (moda) y patrón de cromatóforos de la zona dorsal y ventral de la cabeza y manto de paralarvas de *Todarodes sagittatus* en estadio XXX (n = 15), estadio XXXII (n = 19) y estadio XXXIV (n = 8).

		Estadio XXX			Estadio XXXII		Estadio XXXIV	
		Fila	Moda	Rango	Moda	Rango	Moda	Rango
Cabeza	Dorsal	1	1	0-1	1	0-1	1	1
		2	3	1-4	3	2-4	3	1-4
	Ventral	-	0	0	0	0	0	0
Manto	Dorsal	1	4	1-4	3	2-5	2	2-5
		2	0	0-1	1	0-4	1	0-1
		3	3	2-4	4	2-5	2	2-5
		4	0	0-1	0	0-2	0	0-1
		5	0	0-2	0	0	0	0-1
	Ventral	1	2	1-3	2	2-5	3	2-3
		2	4	2-7	6	3-6	6	3-6
		3	5	1-5	4	2-5	3	2-5
		4	2	0-3	2	0-2	2	1-3

A.8. Datos de la extensión máxima de la probóscide (% de la ratio de LPmax respecto LPrep) de paralarvas de *Todarodes sagittatus* y del tiempo transcurrido hasta alcanzar LPmax (TE), bajo anestesia (n = 4 individuos). LP max, longitud de la probóscide durante máxima extensión; LP rep, longitud de la probóscide en reposo; SD, desviación estándar; TE, tiempo de extensión.

	Media ± SD	Rango
LP rep (mm)	0,67 ± 0,04	0,60-0,71
LP max (mm)	1,16 ± 0,07	1,01-1,27
Extensión (%)	175 ± 5	141,80-212,58
TE (ms)	1599 ± 329	1250-2083