



Desarrollo embrionario del erizo de mar *Paracentrotus lividus*

Iratxe Menchaca

La práctica consistirá en estudiar el proceso de fecundación y primeras etapas del desarrollo embrionario del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Para ello, en primer lugar se obtendrán los gametos, a continuación se procederá a realizar la fecundación *in vitro* y finalmente se identificarán las diferentes fases de segmentación hasta la formación de la larva *pluteus*.

Material de laboratorio (por grupo de trabajo)

- 1 probeta (100 ml)
- 1 vaso de precipitados (100 ml ó 200 ml)
- 1 cuchillo de sierra
- 2 pipetas Pasteur
- 2 pipetas de vidrio
- 1 micropipeta (10–100µl)
- 2 portas
- Microscopio
- Agua de mar filtrada (0,22 µm)
- Cámara climatizada (18–20 °C)
- 5 vasitos de propileno (20ml)
- Contadores
- Guantes de látex
- KCl (0,5 M)
- Formol

Horario

Día 1: Muestreo de 25 ejemplares en el intermareal de Ondarreta (San Sebastián).

Día 1: Obtención de gametos y fecundación

- Rotulado de los viales
- Comprobación la calidad de los gametos
- Fecundación
- Cálculo de la densidad y éxito de fecundación
- Incubación



Día 2: Continúa la incubación

Día 3: Lectura del desarrollo

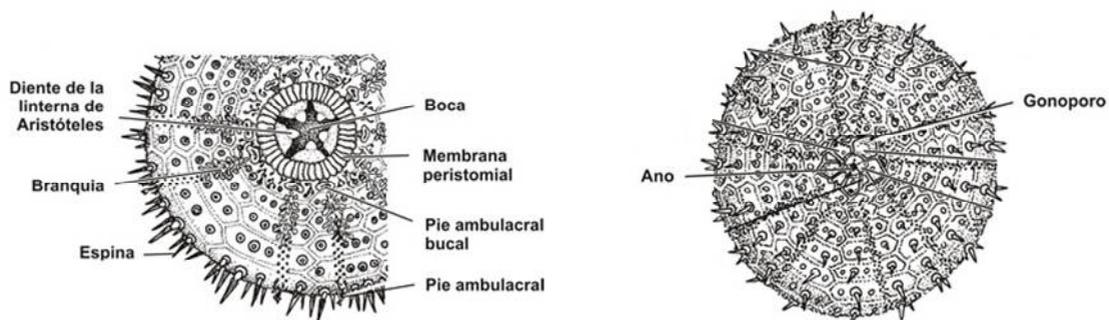
Día 1: Obtención de gametos y fecundación

Rotulado de los viales

Escribir sobre los viales el número (del 1 al 5), la fecha y el número de grupo de trabajo.

Comprobación de la calidad de los gametos

Primero: inyectar a través de la membrana oral (peristoma, zona oral) 1 ml de 0,5M de KCl en agua de mar. Pocos minutos después aparece un líquido espeso en la cara aboral, donde se localizan los gonoporos. Si el líquido es blanquecino se trata de esperma, mientras que si es anaranjado corresponde a óvulos (no existe forma alguna de distinguir los sexos por caracteres externos, los erizos de mar carecen de **dimorfismo sexual**).



Toma una gotita con una pipeta Pasteur, se deposita sobre un porta y se observa al microscopio para observar la **calidad de los gametos**: esperma móvil (5 μ m) y óvulos esféricos (100 μ m). **Importante:** evitar estrujar las gónadas para extraer los gametos, sólo recoger lo que rebose.

Fecundación

Colocar sobre un porta una gota de agua con ovocitos (1 gota de óvulos + 5 ml de agua).

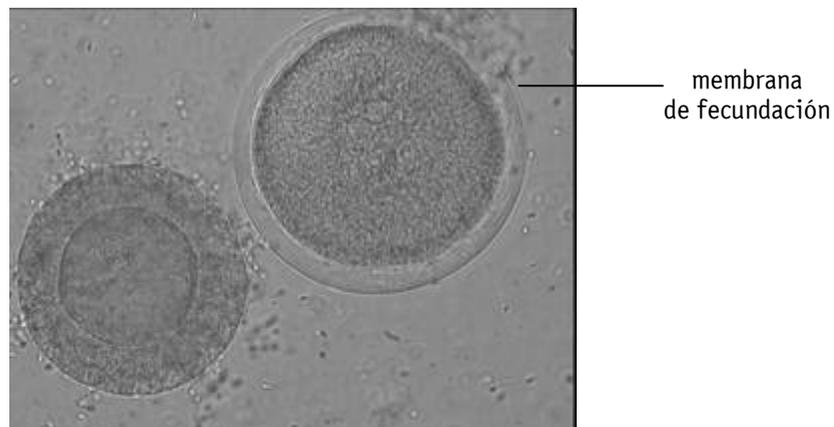
Importante: Enfocar en el microscopio con cuidado de que el objetivo no entre en contacto con el agua salina. Añadir una gota de esperma (1 gota de semen + 10 ml de agua). Remover y observar la progresión de los espermatozoides en dirección a los óvulos. Observar la membrana de fecundación que se forma en menos de 5 min.

El siguiente paso es tomar los gametos, primero **siempre** los huevos, y llevarlos a una probeta de 90ml de agua mar filtrada (20°C). Después depositar una gotita de esperma, y agitar **muy suavemente**.



Cálculo de la densidad y éxito de fecundación

Tras 5 minutos, se toman 4 réplicas de 20 μ L cada una y se depositan sobre un porta. De esta manera, calculamos primero la densidad (número de huevos en los 20 μ L) y segundo el éxito de fecundación, por este orden. Con la densidad hallamos la **mediana** (cálculo aproximado: de los 4 valores tomamos los dos centrales, y de estos dos calculamos la media) de tal forma que en los 20mL de agua de mar filtrada de cada vial, tengamos una densidad final de 25 huevos/mL. Para calcular el éxito de fecundación en las réplicas contamos del total, cuántos están fecundados- aparición de la **membrana de fecundación**.



Para que la fecundación sea viable, el éxito ha de ser superior al 90%. **Importante:** Todo este paso no debe durar más de **30 minutos**, porque a la primera hora de la fecundación ya se producen las primeras divisiones mitóticas, y es cuando los embriones son más sensibles.

Incubación

Una vez hallado el volumen de huevos fecundados (densidad de **25hu/mL**) que se deben añadir a cada uno de los viales de 20mL desde la probeta, se introducen en la incubadora a 20 $^{\circ}$ C durante 48 horas y en completa oscuridad.

Día 2: Continúa la incubación

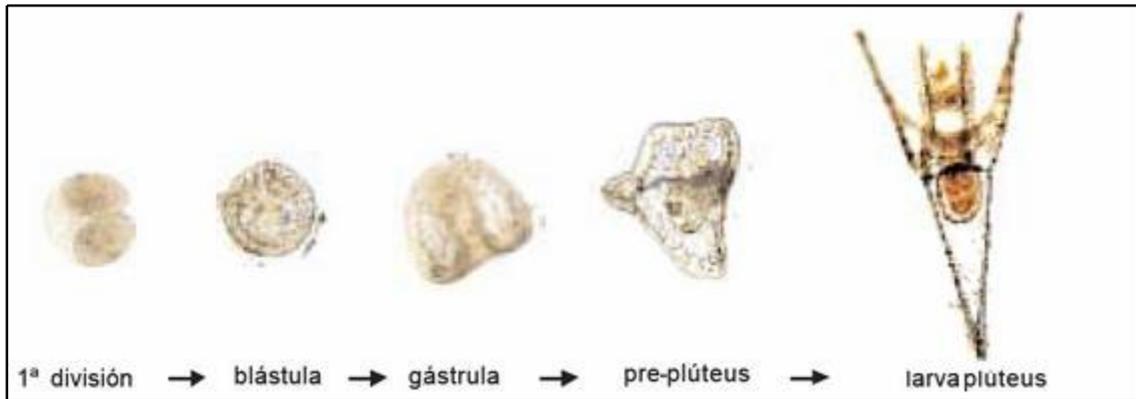
Para observar en el microscopio los principales cambios morfológicos que suceden después de la fecundación y que llevan a la formación de la larva plúteus, se fijan los 5 viales a diferentes tiempos:

- **-Vial 1:** 1 h. 1^a División de segmentación, blastómero con 2 células
- **-Vial 2:** 2 h 30 min. Blástula de 16 células
- **-Vial 3:** 6-12 h. Blástula



- -Vial 4: 24 h. Gástrula
- -Vial 5: 48 h. Larva Pluteus

Día 3: Lectura del desarrollo



Distintos estados embrionarios (modificado de Fernández, 2002).



Cuestiones

1. Calcular la densidad de huevos en 20 μ l. ¿Qué volumen de huevos fecundados deberíamos pipetear en 20 ml de agua de mar para que la concentración final fuese de 25 huevos/ml?
2. Calcular el éxito de fecundación.
3. Calcular el éxito embrionario pasadas 48 horas.
4. Dibujar todas las fases del desarrollo embrionario del erizo de mar vistas en prácticas, desde el óvulo sin fecundar hasta el estadio de larva Pluteus. Y responde:
 - a. ¿Qué características tienen los blastómeros de la mórula de 8 células?
 - b. ¿Qué diferencia hay entre la mórula y la blastula?
 - c. ¿Mediante qué proceso comienza la diferenciación de los primeros tejidos?
 - d. El *Paracentrotus lividus*, ¿es una animal diblástico o triblástico?
5. INVESTIGACIÓN POR TU CUENTA.
 - a. Tras repasar los conceptos de vitelo y segmentación, responde razonadamente sobre la relación que existe entre segmentación y vitelo.
 - b. La segmentación del erizo de mar, ¿es holoblástica o meroblástica?. Razona la respuesta.

Bibliografía

Fernández, N., 2002. *Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar Paracentrotus lividus*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. España. 211 pp.

Garmendia, J.M., I. Menchaca, M.J. Belzunce, M. Revilla, 2009. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Investigaciones Marinas*, AZTI-Tecnalia, 1: 27 pp

http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/Descargas/guion_practica5.pdf