

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO E
IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE TRES POBLACIONES DE *Elysia*
diomedea EN ECUADOR.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Biológicas

LOLA AYMARA MOREANO ARROBO

Quito, 2019

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Lola Aymara Moreano Arrobo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dr. Óscar Pérez

Director de Disertación

04 de febrero de 2019

En memoria de mi padre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, por ser la fortaleza de mi día a día. Por inspirarme con sus historias de lucha y perseverancia, y apoyarme en todos los aspectos personales, sentimentales y académicos con el amor incondicional que solo ellos pueden dar. Por ser mi ejemplo de vida y mi refugio, este y todos mis logros son para ustedes.

A mi hermano, por ese amor tácito que existe entre los dos.

A Felipe, el compañero de mis días, amigo y confidente que me ha brindado su cariño y apoyo durante estos cuatro años.

A Óscar Pérez, por ser un gran mentor y compartir su amor por la ciencia; pero sobre todo por su ayuda, motivación y amistad durante los buenos y malos momentos.

Gracias a Cristian Canales y Fernanda Oyarzun por acogerme en su hogar, aconsejarme y guiarme desde el inicio de este proyecto. A Cristian por su ayuda y paciencia en el laboratorio y en el tiempo compartido.

Al Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Ambientes Costeros, i~mar, a la Universidad de Los Lagos y a su equipo por permitirme utilizar sus instalaciones y enseñarme más sobre las ciencias del mar.

A todos los profesores y profesionales de la facultad que me brindaron ayuda durante la realización de esta investigación.

Finalmente, a mis amigos, por su compañía en llantos y risas.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. OBJETIVOS.....	6
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
5.1. COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO.....	7
5.2. OBTENCIÓN, FIJACIÓN Y FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES.....	7
5.2.1. TINCIÓN CON SONDAS NO INMUNOLÓGICAS.....	8
5.3. HERRAMIENTAS MOLECULARES.....	8
5.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	9
5.4.1. MÁXIMA PARSIMONIA.....	10
5.4.2. INFERENCIA BAYESIANA.....	10
6. RESULTADOS.....	11
6.1. OBSERVACIÓN EN EL CAMPO.....	11
6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA OVIPOSTURA.....	11
6.3. DESARROLLO EMBRIONARIO.....	11
6.4. NACIMIENTO.....	12
6.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	13
7. DISCUSIÓN.....	14
8. CONCLUSIONES.....	19
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
10. FIGURAS.....	26
11. TABLAS.....	32
12. ANEXOS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oviposición de <i>Elysia diomedea</i>	26
Figura 2. Desarrollo temprano de <i>E. diomedea</i>	27
Figura 3. Estadios tempranos de <i>E. diomedea</i> con cuerpos polares y estructura anexa.....	28
Figuro 4. Gástrula y larva de ... <i>E. diomedea</i>	29
Figura 5. Reconstrucción filogenética para el género <i>Elysia</i>	30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades de colecta, fechas y número de especímenes y puestas examinados de <i>E. diomedea</i>	32
Tabla 2. Número de acceso de GenBank para las secuencias de ADN utilizadas en los análisis filogenéticos.....	33
Tabla 3. Características de la ovipostura de <i>E. diomedea</i>	36
Tabla 4. Estadios del desarrollo embrionario de <i>E. diomedea</i> a temperatura ambiente (12-29 °C)	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Descripción soluciones utilizadas.....	38
Anexo 2. Plataformas rocosas de las localidades de estudio.....	39
Anexo 3. Embriones en estadio de gástrula con cuerpos polares.....	40
Anexo 4. Vista panorámica de estructura anexa en embriones de <i>E. diomedea</i>	41

1. RESUMEN

Elysia diomedea, conocida como “la bailarina mexicana”, es una especie común de babosa de mar, perteneciente a la infraclase Opisthobranchia y al orden Sacoglossa. A pesar de su amplia distribución y abundancia, los únicos datos acerca de su comportamiento y ecología fueron reportados en 1973, pero se desconoce en gran parte su historia de vida, sus estrategias reproductivas y desarrollo embrionario.

Es por esto que el presente estudio tiene como objetivo la descripción de las fases de desarrollo embrionario y la identificación genética de tres poblaciones de *E. diomedea* geográficamente distantes. Para esta investigación, se colectaron y mantuvieron en condiciones de laboratorio a individuos recogidos en intermareal rocoso de las localidades: 1) Playa de Ballenita, en la provincia de Santa Elena, 2) Playa la Cabuya, provincia de Manabí y 3) Playa Mompiche en la provincia de Esmeraldas.

Los resultados demuestran que las tres poblaciones analizadas pertenecen a la especie *E. diomedea*, a pesar de sus diferencias morfológicas. Las oviposturas obtenidas presentan el mayor diámetro registrado dentro del género *Elysia* y, por tanto, el mayor número de huevos por oviposición (~39.000 huevos). Esta información nos permite realizar correcciones en la descripción previa de la especie, determinando que presenta un solo embrión por cápsula y alrededor de 98 embriones por mm² de puesta. Por otro lado, se documenta que su patrón de desarrollo es típico de especies congéneres; no obstante, se registra un estadio transitorio de tres células, descrito por primera vez para este género. Finalmente, el desarrollo concluye con la eclosión de una larva veliger de 11 a 12 días después de la oviposición.

Estos hallazgos contribuyen al conocimiento acerca del grupo Sacoglossa en nuestro país y resaltan la importancia del estudio de distintos grupos taxonómicos para la obtención de nuevos modelos de desarrollo para la ciencia.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, Poecilogonia, Opisthobranchia, *Elysia*, Filogenia

2. ABSTRACT

Elysia diomedea, colloquially known as "the mexican dancer", is a widespread specie of sea slug, that belongs to the infraclass Opisthobranchia and the order Sacoglossa. In spite of its wide distribution and abundance, the only available data regarding its behavior and ecology were reported in 1973; therefore, its natural history, reproductive strategies and embryonic development are largely unknown. The present study focuses on a detailed description of the stages of embryonic development, and genetic identification of three geographically distant populations. Individuals used in this study were collected on the intertidal rock platform of the following localities: 1) Ballenita Beach, Santa Elena Province, 2) La Cabuya Beach, Manabí Province, and 3) Mompiche Beach, Esmeraldas Province.

The results presented here show that the three populations analyzed belong to the *E. diomedea* species, despite their morphological differences. The ovipositions obtained possess the largest diameter registered within the *Elysia* genus and, therefore, the highest number of eggs per oviposition (~ 39,000 eggs). This information allows us to correct previous species descriptions and confirm that a single embryo is present within each capsule and about 98 embryos can be found per mm² of egg mass. In addition, we elucidate its development pattern, which is typical of congeneric species and other sacoglossans, with the exception of the existence of a transitory three-cell stage, which is described for the first time for this genus. *E. diomedea* early development comes to completion, 11 to 12 days after oviposition, with the hatching of veliger larvae.

These findings contribute to current knowledge on Sacoglossa in our country and highlight the importance of studying different taxonomic groups to obtain new development models.

Keywords: Embryonic development, Poecilogony, Opisthobranchia, *Elysia*, Phylogeny

3. INTRODUCCIÓN

Elysia diomedea es una babosa de mar perteneciente al filum Mollusca, a la infraclase Opisthobranchia y al orden Sacoglossa (Marcus, 1982). Fue descrita en 1894 por el malacólogo Rudolph Bergh y clasificada dentro del género *Tridachia*, para luego ser clasificada como *Tridachiella* (MacFarland, 1924). Finalmente, con base en análisis filogenéticos basados en datos morfológicos (Gosliner, 1995) y moleculares (Händeler *et al.*, 2009), estos géneros se consideraron sinónimos de *Elysia*.

Elysia diomedea se encuentra distribuida a lo largo de la costa este del Pacífico: desde el Golfo de California (Bertsch & Smith, 1973), hasta la Costa norte de Perú (Uribe, *et al.*, 2013). Los adultos de esta especie miden alrededor de 40 a 60 mm de largo, son monoicos y tienen una concha generalmente reducida o ausente (Berscht y Smith, 1973). Al igual que muchas de sus congéneres, tiene la capacidad de secuestrar, retener y mantener funcionales los cloroplastos de las algas de las que se alimenta (Händeler, *et al.*, 2009). Pese a que se ha registrado que es una especie abundante en el Golfo de California y México, los únicos datos acerca de su comportamiento y ecología fueron reportados por Berscht y Smith (1973), por lo que se desconoce en gran parte su historia de vida.

A pesar de que no existe una descripción formal de sus estrategias reproductivas, se ha determinado, mediante observación en criaderos, que *E. diomedea* presenta desarrollo planctotrófico (Rudman, 2006); es decir que aunque la yema aporta la energía necesaria para formar una larva, esta no es suficiente para formar un juvenil; es por esto que se generan una larva de vida libre antes de iniciar la metamorfosis (Chia, Gibson y Qian, 1996). Se ha descrito que su ovipostura, al igual que en otros opisthobranchios, consiste en una cinta gelatinosa en forma de espiral, que se adhiere a las rocas o algas huéspedes (Berscht y Smith, 1973; Ellingson y Krug, 2006; Contreras y Pérez, 2010). Se ha registrado que en un segmento de 2 mm de su puesta espiral, pueden existir entre 14 a 16 cápsulas con 6 a 14 embriones por cápsula (Berscht y Smith, 1973). Finalmente, se ha determinado que esta especie presenta una larva velíger (Rudman, 2006), pero no existe una descripción certera de su desarrollo embrionario.

Una característica importante dentro del grupo de los opistobranquios es que presentan estrategias reproductivas y de desarrollo embrionario y larval muy variadas, como desarrollo planctotrófico, lecitotrófico y directo, que han sido estudiadas en varios casos (Thompson, 1967; Giménez, Gonzales y Garrote, 2011; Ellingson y Krug, 2006; Clark y Jensen, 1981; Chia, Gibson y Qian, 1996). El género *Elysia* es un caso muy especial de plasticidad en estrategias reproductivas, pues en algunas especies de este género se ha documentado plasticidad en el desarrollo larval, incluso dentro de una misma especie, fenómeno denominado *poecilogonia* (Bouchet, 1989; Knott y McHugh, 2012; Taylor y McCain, 2010). La poecilogonia consiste en un polimorfismo del desarrollo larval de ciertos invertebrados marinos, como poliquetos y opistobranquios, que les permite desarrollar una larva planctotrófica, lecitotrófica o de desarrollo directo (Bouchet, 1989; Knott y McHugh, 2012; Taylor y McCain, 2010). Este fenómeno fue reportado por primera vez en 1905, pero estudios recientes han demostrado que varias de las especies en las que se había registrado eran especies crípticas (Chia, Gibson y Qian, 1996). Actualmente, se ha comprobado que sólo ocho especies presentan este dimorfismo larval: 3 de poliquetos (*Streblospio benedicti* y *Boccardia wellingtonensis* y *Boccardia proboscidea*) y 5 de Sacoglossos (*Elysia chlorotica*, *Elysia timida*, *Elysia pusilla*, *Costasiella ocellifera* y *Alderia willowi*) (Vendetti, Trowbridge y Krug, 2012; Knott y McHugh, 2012). En consecuencia, para la confirmación de este fenómeno el principal requisito es determinar si todas las poblaciones e individuos estudiados pertenecen a la misma especie (Hoagland y Robertson, 1988).

Para la determinación genética de una especie, es necesario demostrar que existe una baja divergencia génica que permita descartar la posibilidad de especies crípticas, a través de técnicas moleculares (Knott y McHugh, 2012).

En varios estudios se ha utilizado genes mitocondriales para elucidar las relaciones filogenéticas dentro del grupo de Opisthobranchia (Medina y Walsh, 2000; Thollessen, 1999; Colgan, *et al.*, 2000), de la familia Plakobranchidae (Bass, 2006; Bass y Karl, 2006) y del género *Elysia* (Vendetti, Trowbridge y Krug, 2012; Krug, Vendetti y Valdés, 2016; Pierce, *et al.*, 2006). Estos estudios se ha constatado que el gen de la subunidad I del citocromo oxidasa (*cox I* o *COI*) y el gen de la subunidad ribosomal pequeña 16S presentan múltiples ventajas para realizar identificación génica a nivel inter e intraespecífico. Entre las ventajas se enumeran: falta de intrones, exposición limitada a la recombinación, alto número de copias en cada célula, carácter haploide y un modo

materno de herencia, generalmente estricto (Bucklin, Steinke, & Blanco-Bercial, 2011). Respecto a los genes mitocondriales, se sabe que son una excelente herramienta filogenética debido a que su evolución es lo suficientemente rápida como para permitir una diferenciación entre especies estrechamente relacionadas, además de discriminar la variación intraespecífica, taxonómicamente significativa, asociada con la estructura geográfica (Hebert *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha utilizado al gen nuclear que codifica para la histona 3 (H3), debido a que este presenta múltiples copias en el genoma y evoluciona muy lentamente, es decir, es un gen altamente conservado que proporciona información sobre las relaciones filogenéticas de organismos relacionados (Colgan, *et al.*, 2000; Tatcher y Gorovsky, 1994).

En Ecuador existen poblaciones de esta especie a lo largo de toda la costa (observación personal); sin embargo, no se ha determinado si existe alguna diferencia, ya sea morfológica o genética entre poblaciones que permita identificarlas como distintas especies. Definir la identidad genética de estas poblaciones, abre las puertas a un estudio más profundo de su ecología e historia de vida, llenando el vacío que ha existido desde su primera descripción. Así también, el precisar si existen variaciones durante la embriogénesis entre poblaciones, sería una herramienta poderosa para determinar caracteres ancestrales y derivados en un marco filogenético.

En consecuencia, esta investigación tiene como objetivo develar la primera descripción del desarrollo temprano de *Elysia diomedea* y la primera identificación genética de distintas poblaciones en Ecuador, contribuyendo al conocimiento acerca del grupo Sacoglossa en nuestro país y enfocando la atención de la ciencia sobre la gran variación en los modelos de desarrollo temprano observados dentro de Opisthobranchia.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el desarrollo embrionario y la identidad genética de tres poblaciones de *Elysia diomedea*

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar si las tres poblaciones estudiadas pertenecen a la misma especie.
- Observar y describir el desarrollo embrionario de *Elysia diomedea*.
- Determinar si *Elysia diomedea* es una especie poecilogónica, por medio de la observación de embriones y larvas de individuos de tres poblaciones del Ecuador.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO

Para esta investigación se colectaron 46 ejemplares de la babosa de mar *Elysia diomedea*, recogidos en intermareal rocoso de las localidades: 1) Playa de Ballenita, provincia de Santa Elena (2 ° 12 21.4 S, 80 ° 52 50.98 W). 2) Playa la Cabuya, provincia de Manabí (0° 02 58.83 S, 80° 08 35.59 W). 3) Playa Mompiche, provincia de Esmeraldas (0° 30 25.63 N, 80° 01 47.66 W).

Los individuos fueron recogidos manualmente de la plataforma rocosa durante la marea baja. Fueron fijados en el campo 17 individuos en total, en etanol absoluto, para su posterior análisis molecular.

Los especímenes vivos fueron transportados en contenedores con bombas aireadoras hasta el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en Quito, donde fueron separados y se mantuvieron en un acuario por localidad. Los acuarios contenían un filtro de base plástica, cubierto por una base de conchilla y arena, que permitía que el agua sea filtrada y limpiada constantemente. Finalmente, se llenó a los acuarios con agua de mar que se mantenía almacenada en las instalaciones del laboratorio, rocas y algas obtenidas en cada una de las localidades de colecta.

Los acuarios fueron ubicados al lado de una ventana para mantener condiciones de luz naturales (12 horas luz-12 horas oscuridad) y se mantuvieron a temperatura ambiente, oscilando entre los 12 °C hasta 30 °C.

5.2. OBTENCIÓN, FIJACIÓN Y FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES

La fijación se realizó incubando los embriones en Paraformaldehído 4% diluido en PBS 1X durante 12 horas a 4°C. Posterior a esto, se lavó a los embriones 3 veces cada 10 minutos con PBS con Tritón o PBT (0.1% Tritón en PBS 1X), que fueron almacenados a 4°C en viales con PBS 1X. La preparación de las soluciones se detalla en el Anexo 2.

Para las observaciones y fotografías se lavó a los embriones con PBS 1X y se separaron por estadio con pinzas de relojero Dumont #5 en placas cóncavas de vidrio. Las

fotografías se realizaron en un estereoscopio de disección SZX2-ILLT más fibras ópticas Olympus LG- PS2 y en el microscopio invertido ZEISS TELAVAL 31. Se tomaron fotografías con la cámara Infinity 1 en el software Infinity Capture de Lumenera® y su procesamiento y edición se realizó en Adobe Photosop CS6.

5.2.1. DETECCIÓN O MARCAJE DE NÚCLEOS CELULARES Y ACTINA.

Cuatro estadios fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-phenylindole o DAPI que es un tinte fluorescente que marca ácidos nucleicos tiene una longitud de emisión de 461 nm, que se revela en luz azul con la ayuda de un microscopio de fluorescencia y con la sonda no inmunológica *Phalloidin* (Adams y Pringle, 1991), que marca los filamentos de actina de las células y presenta una longitud de onda de 668 nm de emisión, revelándose de color rojo. Se realizaron placas en portaobjetos, se cubrió a los embriones con una gota de glicerol 70%, cubreobjetos y se selló con esmalte. Estas placas fueron almacenadas en una caja protegida de la luz.

Las fotografías de microscopía confocal fueron tomadas en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA BIO-BIO) de la Universidad de Concepción, Chile, con un microscopio confocal espectral de dos fotones LSM780 NLO Zeiss y editadas en el software ImageJ® y Adobe Photosop CS6.

5.3. EXTRACCIÓN DE ADN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para la determinación de la especie se realizaron extracciones de ADN del tejido muscular de 17 individuos de *E. diomedea* como se detalla en la tabla 1, con el Kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Se amplificaron tres fragmentos de los siguientes genes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): 1) un fragmento de 420 pares de bases (pb) del gen mitocondrial de la subunidad ribosomal 16S usando primers 16Ssar 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3' y 16sa 5'-CTC CGG TTT GAA CTC AGA TC-3' (Palumbi, 1996), 2) un fragmento de 658 pb del gen mitocondrial de la subunidad I del citocromo c oxidasa (COI) con primers LCO1490 5'-GGT CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' y HCO2198 5'-TAA ACT

TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (Folmer et al., 1994) y, finalmente, 3) un fragmento de 328 pb del gen nuclear de la histona 3 (H3) usando primers H3F 5'-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC-3' y H3R 5'-ATA TCC TTR GGC ATR GTG AC-3' (Colgan et al. 2000). Las condiciones de reacción (30 µL) consistían en 1X PCR Buffer [200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] (Invitrogen), 5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂ (COI y 16S) y 1 mM (H3), 0,2 µM de cada primer, 0,8 mM de dNTPs y 0,4 g/mL de albumina de suero bovino (BSA). Las condiciones para la amplificación de 16S consistieron en un paso inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C de denaturación, 90 segundos a 46°C, 60 segundos a 72°C y un paso final de 10 minutos a 72°C para. Para COI, las condiciones fueron las mismas, exceptuando el número de ciclos (i.e. 40 ciclos). Para H3 se repitieron las condiciones de amplificación de 16S, cambiando únicamente la temperatura de anillamiento, de 46°C a 44°C. Debido a problemas en la amplificación, este gen no fue incluido en los análisis posteriores. El secuenciamiento de cada fragmento fue realizado por Macrogen® Korea (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

5.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Una vez obtenidas las secuencias, se ensamblaron, editaron y consensuaron a través del programa Geneious 11.1.5 (GeneMatters Corp). Se incluyeron secuencias disponibles en GenBank pertenecientes a 73 especies del género *Elysia* y se utilizó como grupo externo a 3 especies del género *Plakobanchus* (Krug, Vendetti, & Valdés, 2016). Una lista completa de las muestras analizadas, incluyendo sus números de acceso GenBank, aparecen detallados en la tabla 2.

Las secuencias fueron alineadas en el programa Geneious utilizando el algoritmo de alineamiento incorporado, ClustalW. La matriz obtenida fue importada a Mesquite 3.51 (Maddison y Maddison, 2009) y las regiones alineadas ambiguas fueron ajustadas manualmente para producir una alineación parsimoniosa. Las secuencias de ADN fueron traducidas a aminoácidos con Mesquite para revisar la alineación y verificar la ausencia de codones STOP.

Debido a que el conjunto de datos incluye varios genes, es poco probable que se ajuste a un único modelo de sustitución nucleotídica. Por lo tanto, los datos fueron divididos de acuerdo con la posición del gen y el codón para analizar cada partición bajo modelos separados de evolución. Para esto se utilizó el software PartitionFinder v. 1.1.1

(Lanfear, et al. 2012) que estima simultáneamente el modelo evolutivo más adecuado para cada una de las cuatro particiones: (1) gen 16S; (2) primera posición de los codones de COI; (3) segunda posición de los codones de COI; y (4) tercera posición de los codones de COI. En 16S no se realizaron particiones debido a que este no es un gen codificante.

Se realizaron análisis filogenéticos bajo los criterios de máxima parsimonia e inferencia Bayesiana:

5.4.1. MÁXIMA PARSIMONIA.

El análisis de Máxima Parsimonia se realizó en el software GARLI versión 2.0 (Zwickl, 2006) usando los ajustes predeterminados. Se consideró que los valores de verosimilitud similares (diferencia < 2 unidades \ln) eran indicativos de que las búsquedas habían sido exhaustivas. El soporte para cada nodo se evaluó utilizando 100 réplicas de bootstrap. Se obtuvo el árbol consenso en el programa Mesquite utilizando la regla de mayoría del 50%.

5.4.2. INFERENCIA BAYESIANA.

Este análisis se realizó en el programa MrBayes 3.2 (Ronquist, et al. 2012). Se corrieron cuatro análisis independientes utilizando el algoritmo de la cadena Markov de Monte Carlo con cuatro cadenas por 30×10^6 generaciones. Cada corrida fue muestreada cada 1000 generaciones. El primer 10% de los árboles muestreados se descartó como *burn-in* y los árboles restantes se usaron para estimar el árbol bayesiano, las probabilidades posteriores y otros parámetros del modelo. Se utilizó el programa Tracer 1.5 para confirmar la convergencia y estacionalidad de las estimaciones de parámetros usando un umbral de ESS de 200 (Rambaut y Drummond, 2007).

6. RESULTADOS

6.1. OBSERVACIÓN EN EL CAMPO

La longitud promedio de los individuos colectados en Mompiche fue de 3.2 ± 0.53 cm ($n=14$), de 4.6 ± 0.6 cm ($n=7$) en Cabuya, y de 7.4 ± 0.82 cm ($n=10$) en Ballenita. Se observó que en cada localidad la plataforma rocosa se encontraba formada por diferentes sustratos (Anexo 2).

6.2. CARÁCTERÍSTICAS DE LA OVIPOSTURA

En el laboratorio, únicamente se reprodujeron los individuos de la localidad Ballenita, de los que se obtuvieron 5 oviposturas en un lapso de tres meses. Se observó que antes de la cópula los individuos presentaban un aumento de actividad y procuraban múltiple contacto entre sí. Para el desove, la madre adoptaba una posición de en forma de “U” como se puede observar en la Figura 1A.

El tiempo de desove se prolongó entre tres y cinco horas, dependiendo de la longitud de la puesta. Las oviposturas consisten en una cinta espiral antihoraria de color blanco formada por una matriz gelatinosa en la que se encontraban embebidas las cápsulas. Se encontraron puestas adheridas a las paredes de los acuarios y a las algas *Padina* sp. y *Codium* sp. (Figura 1B y 1C).

El diámetro de las oviposturas fue de 3.0 ± 0.6 cm ($N= 5$), siendo el ancho de la cinta de 1 mm y la longitud de 35.2 ± 10.5 cm ($N= 5$), El número de embriones por mm^2 de ovipostura fue de 98 ± 9.21 ($N= 5$), con solo un embrión por cápsula (información resumida en la tabla 3).

6.3. DESARROLLO EMBRIONARIO

El desarrollo, a lo largo de la puesta, fue sincrónico; no obstante, se observó un número no cuantificado de embriones en desarrollo asincrónico o que no habían clivado. Los embriones en estadio de una célula midieron 62.06 ± 6.93 μm ($N= 20$). En la Tabla 4, se resume el tiempo de cada etapa de desarrollo embrionario a temperatura ambiente (12-29 °C). Inmediatamente después de la oviposición, los cuerpos polares se distinguían

en el huevo. El primer clivaje en el embrión temprano ocurrió 40 minutos después de la oviposición, lo que resultó en dos blastómeros de distinto tamaño: siendo AB ligeramente más pequeño que CD (Fig. 2B). Durante este este estadio, los cuerpos polares se ubicaron en la estrangulación de ambas células. Se encontró un estadio de tres células en el que se observa que no son completamente redondas, sino ovaladas (Fig. 2C). El tercer clivaje (Fig. 2D) ocurrió entre una hora y media a dos horas después de la oviposición, formando cuatro blastómeros que convergen en el centro –dos de ellos más pequeños (A y B), es decir, ocurre una división asimétrica del citoplasma. El cuarto clivaje ocurrió de cinco a seis horas después de la oviposición.

Los dos cuerpos polares se mantuvieron hasta el inicio de la gastrulación (Anexo 3) y, después de este estadio, ya no fueron visibles. La gastrulación ocurrió cuatro días después de la oviposición; durante este estadio el embrión presentó forma de corazón (Fig. 2H). Posterior a esto, la gástrula comenzó a alargarse, tomando una forma más ovoide a la que aparecen cilios en toda la superficie y se mueve dentro de la cápsula (Fig. 2I).

Durante la observación *in vivo* de los embriones, se encontró la presencia de una estructura anexa al embrión. Esta estructura es semejante a una burbuja y podría estar encerrando a los cuerpos polares (Fig. 3A y Fig. 2B) o en el lugar contrario a estos (Fig. 3B), en algunos casos existió más de una de estas estructuras en un mismo embrión (Fig. 3C y 3D) y se encontró hasta el estadio de 32 a 64 células, perdiéndose en el estadio de blástula (Anexo 4). Además, los procesos de fijación eliminaron estas estructuras, siendo imposible su análisis posterior.

6.4. NACIMIENTO

Once días post oviposición, la larva se formó por completo y su movimiento dentro de la cápsula aumentó, pero aún no eclosionó. Se observó que el movimiento de la larva empieza a deteriorar a la cápsula facilitando su ruptura. Después de doce días ocurrió el nacimiento y las larvas veliger eclosionaron al azar a lo largo de la puesta, las larvas que eclosionan realizan movimientos rápidos y rotacionales que deterioran a las cápsulas que aún no han eclosionado; se puede distinguir la concha larval, el velo bilobulado, la glándula digestiva, los estatocistos y el movimiento de los cilios (Fig. 4 C y D).

6.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La matriz completa de datos de secuencias de ADN contenía dos genes y 1116 pares de bases (pb) para 116 muestras. Para los análisis de los genes mitocondriales, PartitionFinder eligió cuatro particiones como la mejor estrategia (el mejor modelo entre paréntesis): gen 16S (GTR+I+G), primera posición de los codones de COI (HKY+G), segunda posición de los codones de COI (SYM+G) y tercera posición de los codones de COI (GTR+I+G).

Las topologías de los árboles para máxima parsimonia y las filogenias bayesianas fueron similares, excepto para los nodos con soporte débil (probabilidad posterior, pp <0.5 y bootstrap <50). Los especímenes analizados de *E. diomedea* fueron agrupados en un clado con alto soporte (pp > 0.98; bootstrap > 75) como se observa en la figura 5, junto a individuos colectados en Centro y Norte América (ver tabla 2) (Bass, 2006; Krug *et al.*, 2015).

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se identifica exitosamente a tres poblaciones de *Elysia diomedea*, dado que las relaciones filogenéticas obtenidas del análisis de las secuencias de ADN mitocondrial (Fig. 5) fueron consistentes con las reportadas por Krug, Vendetti y Valdés (2016) para el género *Elysia*. Por lo tanto, es probable que la diferencia de tamaños observada entre poblaciones se deba a la edad de los individuos analizados. Esta idea se sustenta en que los individuos más grandes, pertenecientes a la localidad Ballenita, fueron los únicos que se reprodujeron, es decir, que posiblemente eran adultos. Los individuos de las localidades restantes, que presentaron un menor tamaño y no se reprodujeron, probablemente eran juveniles. Para confirmar esta hipótesis son necesarios estudios en los que se pueda realizar un seguimiento del ciclo de vida completo de estos individuos.

En cuanto a las diferencias observadas en la abundancia de la especie en las plataformas rocosas de cada localidad, existe una diferencia en la conformación de sus sustratos: en la localidad Ballenita la plataforma se encuentra formada por areniscas, calizas, limolitas y lutitas (IGM, 1974), en la localidad Cabuya la plataforma consiste en arena, arenisca y conglomerado (IGM, 1980); en ambos puntos de colecta, existía una alta abundancia de nudibraquios del género *Dolabrifera* comparado a *E. diomedea*; en la localidad Mompiche, la plataforma estaba conformada de areniscas tobáceas (Egüez, Gaona y Albán, 2017) donde *E. diomedea* fue la especie más abundante. La conformación de los sustratos, además, sugiere una diferencia en la diversidad de algas en cada localidad, y se sabe que existe una disimilaridad del 63% en la conformación de algas entre la región norte (Esmeraldas) y sur (Sta. Elena) (Franco, 2012).

Respecto al desarrollo embrionario temprano, el tiempo de desarrollo observado en *E. diomedea* se encuentra dentro del rango descrito para otras especies planctotróficas del género *Elysia*, que puede variar entre 5 a 23 días (Krug, 2009). Este intervalo de tiempo podría estar determinado por el número de huevos de la puesta, pues en especies como *E. hedgpethi* y *E. maorí*, que presentan masas de huevos que contienen varios miles de huevos, el período embrionario hasta la formación de un veliger libre es de catorce días, a diferencia de oviposturas con solo unos pocos cientos de huevos como *E. hamatani* y *E. viridis*, en las que el veliger tarda de cinco a ocho días en formarse y eclosionar (Reid, 1964; Greene, 1968; Hamatani, 1960; Hagerman, 1970; Rahat, 1976).

El tiempo de oviposición es variable dentro del grupo Opisthobranchia y puede prolongarse entre una a diez horas (Hadfield & Switzer-Dunlap, 1984); la oviposición de *E. diomedea* tiene una duración de tres a cinco horas y depende del largo de la puesta, como se ha observado anteriormente en especies como *Stylocheilus striatus* y *Aplysia californica* (Horwitz, Jackson, & Mills, 2017; Ferguson *et al.*, 1989).

Un resultado importante de este estudio es el número de embriones por cápsula que presenta *E. diomedea*. Según la descripción de Berscht y Smith (1973), en 2 mm de puesta de *E. diomedea* existen catorce a dieciséis cápsulas, cada una con cuatro a dieciséis embriones. Desafortunadamente, el artículo en el que se encuentra esta información, carece de imágenes que puedan constatar esto. Sin embargo, en este estudio se observó que en 1 mm de puesta se pueden encontrar alrededor de 100 cápsulas y cada una contiene un solo embrión (Fig. 1D). No se puede definir si esta es una diferencia dada por la localidad, pues los individuos estudiados por Berscht y Smith (1973) fueron colectados en Baja California, México, o podría estar dada por un posible error de identificación de la especie.

La forma, consistencia y lugar de adherencia de las oviposturas es el mismo que en otras especies del género *Elysia* (Reid, 1964; Greene, 1968; Hamatani, 1960; Hagerman, 1970; Rahat, 1976; Ellingson y Krug, 2006; Krug, Vendetti, & Valdés, 2016) y coincide con la descripción de Berscht y Smith (1973) para *E. diomedea* en donde se observaron puestas en las paredes de los acuarios y en el alga *Padina* sp. En cuanto al desarrollo asincrónico observado entre los embriones a lo largo de la puesta, podría deberse a que los espermatozoides quedan atrapados en la gelatina que protege a los huevos y los fecundan en distintos tiempos, como se ha descrito para *Diaulula punctuolata* (Contreras y Pérez, 2010). El tamaño de los embriones, 62.06 μm (SD ± 6.93), se encuentra dentro del rango establecido para sacoglossos planctotróficos que va entre 56 a 100 μm (Clark y Jensen, 1981).

Los embriones de *E. diomedea* presentan un clivaje holoblástico espiral, característico dentro del grupo de moluscos (Gilbert, 2010; Martínez-Pita, Sánchez-España, & García, 2006; Wolf, 2010; Chávez-Viteri, Brown y Pérez, 2017). Como se ha descrito para otros organismos de este clado, los tres primeros clivajes ocurren en un plano meridional produciendo cuatro macrómeros llamados A, B, C y D. En el estadio de dos células se puede observar claramente el blastómero CD (Fig. 2B) que en otros moluscos y anélidos suele dar origen al lóbulo polar (Gilbert, 2010; Lambert y Nagy, 2001; Taylor y McCain, 2010; Henry, Lyons, Perry y Osborne, 2017); el lóbulo polar es

una extrusión citoplasmática que aparece inmediatamente después del primer clivaje (Gilbert, 2010) inexistente en esta especie. Durante el segundo clivaje, ocurrió un desfasamiento en la división de los blastómeros, fenómeno denominado asincronía, en el que la célula AB es la primera en dividirse (Fig. 2C). Este estadio transitorio de tres células se ha registrado únicamente en *Aplysia californica* en la que, al igual que en este caso, el macrómero AB es el primero en dividirse, dando origen a dos células simétricas unidas al macrómero CD que no se ha dividido (Chávez-Viteri, Brown y Pérez, 2017). Posterior a esto, el macrómero CD se divide asimétricamente de manera perpendicular al eje animal-vegetal (AV) dando origen a un macrómero D de mayor tamaño que el C. En consecuencia, se puede identificar fácilmente al macrómero D, pues se ha determinado que, además de ser la célula de mayor tamaño durante este estadio, también es aquella que se encuentra en contacto con el mayor número de células (Lambert y Nagy, 2001; Goulding, 2003; Chávez-Viteri, Brown y Pérez, 2017). No obstante, para corroborar la identidad celular de los macrómeros se necesitan análisis adicionales como marcaje molecular y mapeo de destino celular. Durante los dos primeros clivajes se identifica claramente a los cuerpos polares, que como se esperaba fueron marcados por la sonda no inmunológica DAPI (Fig. 3E y 3F).

Los organismos dentro del grupo Spiralia, presentan una blástula que carece de blastocele, a la que se denomina esteroblástula. Durante este estadio el embrión presenta un tamaño relativamente pequeño y las células están ordenadas de modo que se pueda dar inicio a los movimientos de gastrulación (Rivest, 1978; Gilbert, 2010; Wolf, 2010). Lo más probable es que *E. diomedea* presente también una estereoblástula pero para determinar esto es necesario realizar cortes que nos permitan observar la ausencia o presencia de una cavidad.

En la mayoría de moluscos y de opisthobranchios, la gastrulación ocurre mediante una epíbole que hace que los micrómeros se multipliquen y movilizan, rodeando a los macrómeros vegetales (Gilbert, 2010; Martínez-Pita, Sánchez-España, & García, 2006; Thompson, 1958; Chávez-Viteri, Brown y Pérez 2017; Wolf, 2010), ya que la ausencia de blastocele impide que ocurran movimientos de invaginación (Marshall y Williams, 1985). El movimiento de los micrómeros durante la epíbole cubre al embrión casi en su totalidad, dejando una pequeña hendidura que consiste en el blastoporo en el polo vegetal, que posteriormente será la boca (Fig. 2H, 4A y 4B) (Rivest, 1978; Gilbert, 2010; Wolf, 2010). En la Fig. 4B se puede observar que la gástrula presenta una cavidad cercana al blastoporo; probablemente, esta cavidad sea parte del tubo digestivo, pues se sabe que en

organismos protostomados la boca y el tubo digestivo se origina del blastoporo o de una nueva abertura muy cercana a este (Marshall y Williams, 1985).

Después, la gástrula comienza a elongarse, de manera que pierde la forma de corazón y adopta una forma ovoide (Fig. 4A) en la que inicia la aparición de cilios en la superficie, dando lugar a la larva trocófora que puede rotar dentro de la cápsula (Wolf, 2010). Una vez ocurrido esto, culmina la formación de la larva velíger; los embriones en esta etapa poseen una forma definida y las estructuras empiezan a diferenciarse, por ejemplo: es posible observar los cilios en el lofóforo y en la parte más anterior del espécimen, se puede identificar la concha (Fig. 4C y 4D) y se observa que es una concha tipo 1, es decir, una concha espiral con $\frac{3}{4}$ a una torsión (Thompson, 1960). También se puede identificar una estructura en forma de lóbulo que va a dar origen al pie, sobre el que se van a formar los estatocistos, que cumplen una función importante en el equilibrio de la larva (Hamatani, 1960; Rahat, 1976; Reid, 1964; Wolf, 2010). Finalmente, se formarán estructuras internas que darán origen a la masa visceral (Martínez, 2006); de manera que la larva se ha formado por completo y está lista para eclosionar. Ya que no se observó si el tracto digestivo de las larvas era funcional, no se puede determinar si estas son lecitotróficas o planctotróficas.

Respecto a las estructuras anexas encontradas en los embriones vivos de *E. diomedea* (Fig. 3A-D), podría tratarse de cuerpos polares gigantes y asimétricos como se ha observado en embriones centrifugados del caracol marino *Ilyanassa*, del caracol acuático pulmonado *Limnaea stagnalis* y en el nudibranchio aeolido *Cuthona lagunae* (Clement, 1935; Morrill, 1963; Goddard, 1991). En el caso de *Ilyanassa*, los cuerpos polares se encuentran presentes desde la maduración del oocito hasta el segundo clivaje (Clemente, 1935) y en *Cuthona lagunae* se han registrado hasta el estadio de seis células (Goddard, 1991). Sin embargo, en el caso de *E. diomedea* estas estructuras se mantuvieron hasta el estadio de 32 a 64 células (Fig. 2D), considerando que también hasta este estadio se observan cuerpos polares normales. Por otra parte, el hecho de que estas estructuras se eliminen con la fijación es una sugerencia de la sensibilidad de las mismas y es claro que estas se pierden por completo pues no pudieron ser observadas en las fotografías de microscopía confocal (Fig. 3E-F, 4B y 4D). Por otra parte, Goddard (1991) menciona que los cuerpos polares gigantes podrían servir de reserva de alimento, es decir, hacer las veces de yema extra cigótica (YEC) como se ha reportado en varias especies de moluscos y en especies lecitotróficas, de desarrollo directo e incluso peocilogonas del género *Elysia* (Patrick J. Krug et al., 2016; Thompson & Salghetti-Drioli, 1984; Vendetti, Trowbridge,

& Krug, 2012). Esto sugeriría que *E. diomedea* presenta una estrategia que podría ser de ayuda en caso de que exista una variación en su desarrollo larval: ya sea que esta variación se origine por condiciones climáticas, de contaminación o de escasez de alimento (Ellingson & Krug, 2006).

La presencia de esta estructura plantea una nueva hipótesis en el desarrollo de *E. diomedea*, priorizando la investigación de la misma. Para confirmar la identidad de estas estructuras es necesario realizar un seguimiento a su origen y destino, además de un análisis de su constitución química, pues se podría tratar únicamente de extrusiones de citoplasma, agua o sustancias lipídicas.

Considerando que no se obtuvieron puestas de individuos de las dos localidades restantes, es imposible determinar si existe alguna diferencia que confirme o desacredite la hipótesis de la existencia de poecilogonia en esta especie. En lugar de esto, se verifica que el tamaño de los embriones sin clivar, el número de embriones por ovipostura y el relativamente corto periodo embrionario, observados en *E. diomedea*, son típicos de especies de opistobranquios con larvas de desarrollo planctotrófico (Thompson, 1967). Mas, la presencia de estructuras anexas, aumenta la posibilidad de que exista un polimorfismo en el desarrollo larval de esta especie.

Sería aconsejable realizar un análisis previo, de la abundancia y características de los individuos en cada una de las localidades, a lo largo de los períodos estacionales, para comprender de mejor manera su ciclo de vida y poder determinar un tamaño para juveniles y adultos; facilitando de esa manera la identificación y colección en próximos estudios.

Dado esto, se sugiere realizar más estudios relacionados a la historia de vida de *E. diomedea* y así comprender de mejor manera su ciclo de vida, ecología y reproducción.

La importancia de la investigación en organismos del grupo Spiralia, radica en la poca información que se tiene acerca de su desarrollo, a pesar de que este es uno de los grupos más amplios y diversos en el reino Animalia (Lyons y Henry, 2014); además de ampliar nuestros conocimientos respecto a especies que presentan clivaje espiral. Hecho que haría posible comparar embriones de taxones distantemente relacionados utilizando linajes de células homólogas, además de características morfológicas y patrones de expresión génica, como se ha venido haciendo en los últimos años (Lyons y Henry, 2014).

Por este motivo, el estudio de *E. diomedea* podría entregarnos a una nueva especie modelo por su facilidad de colección y mantenimiento en condiciones de laboratorio.

8. CONCLUSIONES

Las tres poblaciones estudiadas, pertenecen a la especie *E. diomedea*. Dado que, se desconoce gran parte de la ecología e historia de vida de esta especie la identificación genética de la misma, abre las puertas a la investigación de este organismo.

Las oviposturas de *E. diomedea* presentan el mayor diámetro y longitud registrados dentro del género *Elysia* y por tanto el mayor número de huevos por oviposición (~39.000 huevos).

Los resultados obtenidos nos permiten realizar correcciones en la descripción previa de la especie, determinando que presenta un solo embrión por cápsula y alrededor de 98 embriones por mm² de puesta.

El embrión en estadio de una célula de *E. diomedea*, midió $62.06 \pm 6.93 \mu\text{m}$, valor que se encuentra dentro del rango establecido para especies planctotróficas.

El patrón de desarrollo de *E. diomedea* es típico de especies congéneres y otros sacoglossos, siendo su clivaje holobástico espiral.

Durante el desarrollo temprano se registra un estadio transitorio de tres células descrito por primera vez para este género.

El desarrollo de *E. diomedea* concluye con la eclosión de una larva veliger de 11 a 12 días después de la oviposición.

No se obtuvo información suficiente para determinar si *E. diomedea* es una especie poecilogona, por lo que se sugieren estudios a futuro, que permitan confirmar o descartar esta hipótesis.

La investigación embriológica de *E. diomedea* es una gran herramienta para comprender de mejor manera el modelo de desarrollo dentro del grupo Spiralia.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, A., y Pringle, J. (1991). Staining of actin with fluorochrome-conjugated phalloidin. *Methods in Enzymology*, 194, 729-731. DOI: 10.1016/0076-6879(91)94054-G

Bass, A. (2006). Evolutionary Genetics of the Family Placobranchidae (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia: Sacoglossa) (Disertación doctoral), Universidad del Sur de Florida, Estados Unidos.

Bass, A. y Karl, S. (2006) Molecular phylogenetic analysis of genera in the family Plakobranchidae (Mollusca: Opisthobranchia: Sacoglossa). *Records of the Western Australian Museum Supplement*, 69, 61–68.

Bertsch, H., y Smith, A. (1973). Southwestern Association of Naturalists Observations on Three Opisthobranchs (Mollusca: Gastropoda) of the La Paz Area, Baja. *Southwestern Association of Naturalists Stable*. 18(2), 165–176. Recuperado de: <http://www.jstor.org/stable/3670417>

Bridges, C. (1975). Larval development of phyllaplysia Taylori dall, with a discussion of development in the Anaspidea (Opisthobranchiata: Anaspidea). *OPHELIA*. 14, 161-184.

Bouchet, P. (1989). A review of poecilogony in Gastropods. *Journal of Molluscan Studies*. 55, 67-78.

Bucklin, A., Steinke, D., & Blanco-Bercial, L. (2011). DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 471–508.

Chávez, Y. (2012). Estudios experimentales de comportamiento en la babosa marina fotosintética *Elysia diomedea* (Opisthobranchia: Sacoglossa) ante distintas condiciones de luz y variedad de dieta (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Escuela De Ciencias Biológicas. Quito, Ecuador.

Chávez-Viteri, Y. E., Brown, F. D., & Pérez, O. D. (2017). Deviating from the Norm: Peculiarities of *Aplysia cf. californica* Early Cleavage Compared to Traditional Spiralian Models. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 328(1–2), 72–87.

Chia, F. (1971). Oviposition, fecundity, and larval development of three sacoglossan opisthobranchs for the Northumberland Coast, England. *Veliger*: 13, 319-325.

Chia, F., Gibson, G. y Qian, P. (1996). Poecilogony as reproductive strategy of marine invertebrates. *Oceanologica Acta*, 19, 3-4

Clark, K. y Jensen, K. (1981). A comparison of egg size, capsule size, and development patterns in the order Ascoglossa (Sacoglossa) (Mollusca: Opisthobranchia). *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 3(2), 57-64.

Colgan D, Ponder W, y Eggler P. (2000). Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zool Scripta* 29, 29–63.

Contreras, R. y Pérez, M. (2010). Desarrollo embrionario y larval temprano en *Dialula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) (Nudibranchia: Doridacea) en condiciones de laboratorio. *Amici Molluscarum*, 18, 13-20

Egüez, A., Gaona, M. y Albán, A. (2017). Mapa Geológico de la República del Ecuador. Ministerio de Minería e Instituto Nacional de Investigación Geológico Minero metalúrgico. Recuperado de: https://www.geoinvestigacion.gob.ec/mapas/nuevo%201M/GEOLOGICO_2017_1M.pdf

Ellingson, R. y Krug, P. (2006). Evolution of poecilogony from planktotrophy: cryptic speciation, phylogeography, and larval development in the gastropod genus *Alderia*. *Evolution*, 60, 2293-2310.

Ferguson G, Ter Maat A, Parsons D, y Pinsker H. (1989). Egg laying in *Aplysia*: I. Behavioral patterns and muscle activity of freely behaving animals after selectively elicited bag cell discharges. *Journal of Comparative Physiology*. 164(6), 835–847. doi: 10.1007/BF00616755.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

Franco, A. (2012). Caracterización ecológica de las comunidades intermareales rocosas a lo largo de una gradiente de productividad en las costas del Ecuador. (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Giménez–Casalduero, F., Muniain, C., González–Wangüemert, M., Garrote–Moreno, A., (2011). *Elysia timida* (Risso, 1818) three decades of research. *Animal Biodiversity and Conservation*, 34, 217–227.

Gosliner, T.M. (1995). The genus *Thuridilla* (Opisthobranchia: Elysiidae) from the tropical Indo-Pacific, with a revision of the phylogeny of the Elysiidae. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 49, 1–54.

Goulding M. (2003). Cell contact-dependent positioning of the D cleavage plane restricts eye development in the *Ilyanassa* embryo. *Development*. 130, 1181–1191.

Greene, R.W. (1970). Symbiosis in sacoglossan opisthobranchs: symbiosis with algal chloroplasts, *Malacologia*, 10, 357-368

Hadfield M. y Switzer-Dunlap M. (1984). Opisthobranchs. In: Tompa AS, Verdonk NH, Van den Biggelaar JAM. The Mollusca. *London: Academic Press*, 209–350.

Hagerman, L. (1970). The influence of low salinity on survival and spawning of *Elysia viridis* (Montagu) (Opisthobranchia, Sacoglossa), *Sarsia*, 42, 1-6.

Hamatani, I. (1960). Notes on veligers of Japanese opisthobranchs, *Seto Marine Biological Laboratory*, 8, 59-70.

Horwitz, R., Jackson, M. D., y Mills, S. C. (2017). The embryonic life history of the tropical sea hare *Stylocheilus striatus* (Gastropoda: Opisthobranchia) under ambient and elevated ocean temperatures. *PeerJ*, 5. doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.2956>

Handeler K, Grzybowski Y, Krug P, y Wagele H. (2009). Functional chloroplasts in metazoan cells: A unique evolutionary strategy in animal life. *Front Zool* 6, 28

Hebert P, Ratnasingham S. y deWaard J. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270, 96–99

Henry, J. Q., Lyons, D. C., Perry, K. J., & Osborne, C. C. (2017). Establishment and activity of the D quadrant organizer in the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *Developmental Biology*, 431(2), 282–296.

Hoagland, K. E., Hoagland, K. E., Robertson, R., y Robertson, R. (1988). An assessment of poecilogony in marine invertebrates: phenomenon or fantasy. *Biological Bulletin*, 174(2), 109–125.

Instituto Geográfico Militar (IGM). (1974). Mapa geológico del Ecuador: SANTA ELENA. Cartas topográficas. Recuperado de: <http://www.geoportalmgm.gob.ec/portal/index.php/cartografia-de-libre-acceso-escala-50k/>.

Instituto Geográfico Militar (IGM). 1974. Mapa geológico del Ecuador: JAMA. Cartas topográficas. Recuperado de: <http://www.geoportalmgm.gob.ec/portal/index.php/cartografia-de-libre-acceso-escala-50k/>.

Knott, K. E., y McHugh, D. (2012). Introduction to symposium: Poecilogony - A window on larval evolutionary transitions in marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 52(1), 120–127.

Krees, A. (1975). Observations During Embryonic Development in The Genus *Doto* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 55, 691-701

Krug, P. J. (2009). Not my “type”: larval dispersal dimorphisms and bet-hedging in Opisthobranch life histories. *Biological Bulletin*. 216, 355–372.

Krug, P. J., Vendetti, J. E., Ellingson, R. A., Trowbridge, C. D., Hirano, Y. M., Trathen, D. Y., y Valdés, A. A. (2015). Species selection favors dispersive life histories in sea slugs, but higher per-offspring investment drives shifts to short-lived larvae. *Systematic Biology*, 64(6), 983–999. doi: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv046>

Krug, P. J., Vendetti, J. E., & Valdés, Á. (2016). Molecular and morphological systematics of *Elysia* Risso, 1818 (Heterobranchia: Sacoglossa) from the Caribbean region. *Zootaxa*. 4148. doi: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4148.1.1>

Lambert, J. D., & Nagy, L. M. (2001). MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Development*. 128(1), 45–56.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S., y Guindon, S. (2012) PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*; 29: 1695– 1701. doi: 10.1093/molbev/mss020 PMID: 22319168

Lyons, D. C., & Henry, J. Q. (2014). Ins and outs of spiralian gastrulation. *International Journal of Developmental Biology*, 58(6–8), 413–428.

MacFarland, F.M. (1924) XXV Expedition of the California Academy of Sciences to the Gulf of California in 1921. Opisthobranchiate Mollusca. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 13, 389–420.

Marcus E. (1982). Systematics of the genera of the order Ascoglossa (Gastropoda). *Journal of Molluscan Studies* 48 (10), 1–31.

Marshall, A. y Williams, W. (1985). *Zoología: Invertebrados, 7ma edición*. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España.

Martínez-Pita, I., Sánchez-España, A. I., y García, F. J. (2006). Some aspects of the reproductive biology of two Atlantic species of Polycera (Mollusca: Opisthobranchia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(02), 391-399.

Medina, M. y Walsh, P.J. (2000). Molecular systematics of the order Anaspidea based on mitochondrial DNA sequences (12S, 16S, and CO1). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15, 41–58.

Palumbi S. (1996) Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *Molecular systematics*. 205–247

Pierce, S., Curtis, N., Massey, S., Bass, A., Karl, S. y Finney, C. (2006). Morphological and molecular comparison between *Elysia crispata* and a new species of kleptoplastic sacoglossan sea slug (Gastropoda: Opisthobranchia) from the Florida Keys, USA. *Molluscan Research* 26: 23–38.

Rahat, M. (1976). Direct development and symbiotic chloroplasts in *Elysia Timida* (Mollusca: Opisthobranchia), *Israel Journal of Zoology*, 25 (4), 186-193

Rambaut A, Drummond A. TRACER.MCMC trace analysis tool, Version 1.4. University of Oxford. Recuperado de: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>. 2007..

Reid, J.D. (1964). The reproduction of the sacoglossan opisthobranch *Elysia maoria*, *Proceedings of the Zoological Society of London*. 143, 365-393

Rivest, B. R. (1978). Development of the eolid nudibranch *Cuthona nana* (Alder and Hancock, 1842), and its relationship with a hydroid and hermit crab. *Biological Bulletin*, 154(5), 157–175.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., y Huelsenbeck, J. (2012). MrBayes 3.2: Bayesian phylogenetic efficient inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*; 61, 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys029 PMID: 22357727

Taylor, P., y McCain, E. R. (2010). Invertebrate Reproduction & Development Poecilogony as a tool for understanding speciation: Early development of *Streblospio benedicti* and *Streblospio gynobranchiata* (Polychaeta: Spionidae) Poecilogony as a tool for understanding speciation: *Early development*. 37–41.

Thollesson, M. (1999). Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene: use of a ‘fast’ gene for ‘higher-level’ phylogenies. *Proceedings of the Royal Society of London*. 266, 75-83

Thompson, T. E. (1960). The importance of the larval shell in the classification of the sacoglossa and the acoela (gastropoda opisthobranchia). *Journal of Molluscan Studies*, 233–238.

Thompson, T. (1967). Direct development in a nudibranch, *Cadlina Laevis*, with a discussion of developmental processes in Opisthobranchia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 47, 1-22.

Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D. (1997). The Clusta IX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*24, 4876–82.

Uribe, R., Nakamura, K., Indacochea, A., Pacheco, A., Hooker, Y. y Schrödl, M. (2013). A review on the diversity and distribution of opisthobranch gastropods from Peru, with the addition of three new records. *Spixiana*, 36(1), 43-60.

Vendetti, J. E., Trowbridge, C. D., y Krug, P. J. (2012). Poecilogony and population genetic structure in *Elysia pusilla* (Heterobranchia: Sacoglossa), and reproductive data for five sacoglossans that express dimorphisms in larval development. *Integrative and Comparative Biology*, 52(1), 138–150. doi: <https://doi.org/10.1093/icb/ics077>

Wolf, M. y Young, C. (2012). Complete development of the Northeast Pacific Arminacean Nudibranch *Janolus fuscus*. *Biological Bulletin*. 222, 137-149.

10. FIGURAS

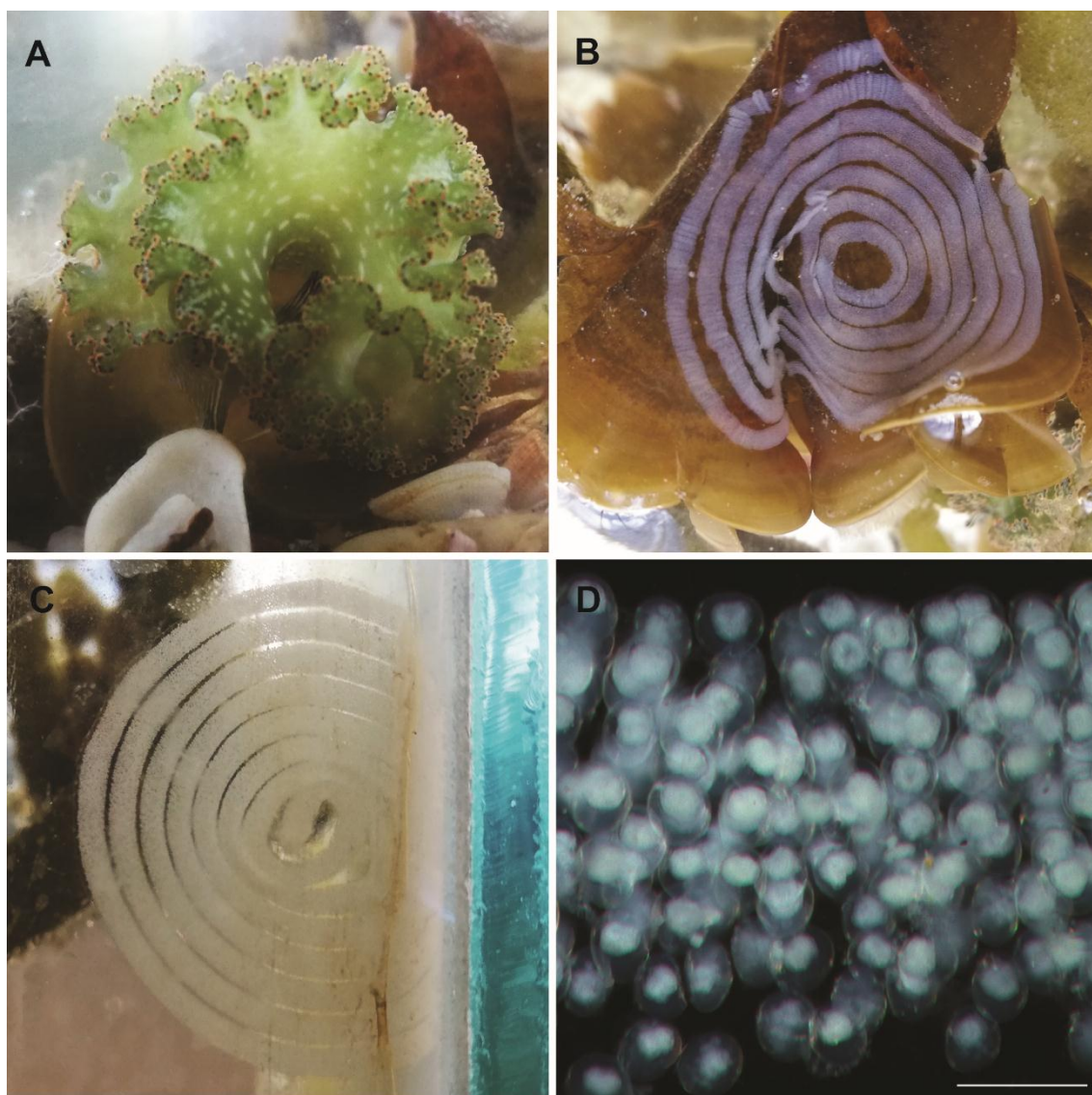


Figura 1. Oviposición de *E. diomedea*. (A) Individuo de *E. diomedea* realizando oviposición sobre alga *Padina sp.* Se puede observar que ha adoptado una forma de “U” que le permitirá dar una forma espiral a la cinta. (B) Puesta de *Elysia diomedea* sobre alga *Padina sp.*, la cinta que conforma la puesta es irregular. (C) Puesta de *E. diomedea* en el cristal del acuario, la cinta que conforma a la puesta es completamente concéntrica. (D) Acercamiento de la masa de huevos de *E. diomedea*; se observa un embrión en cada cápsula. Barra de escala 250 μm

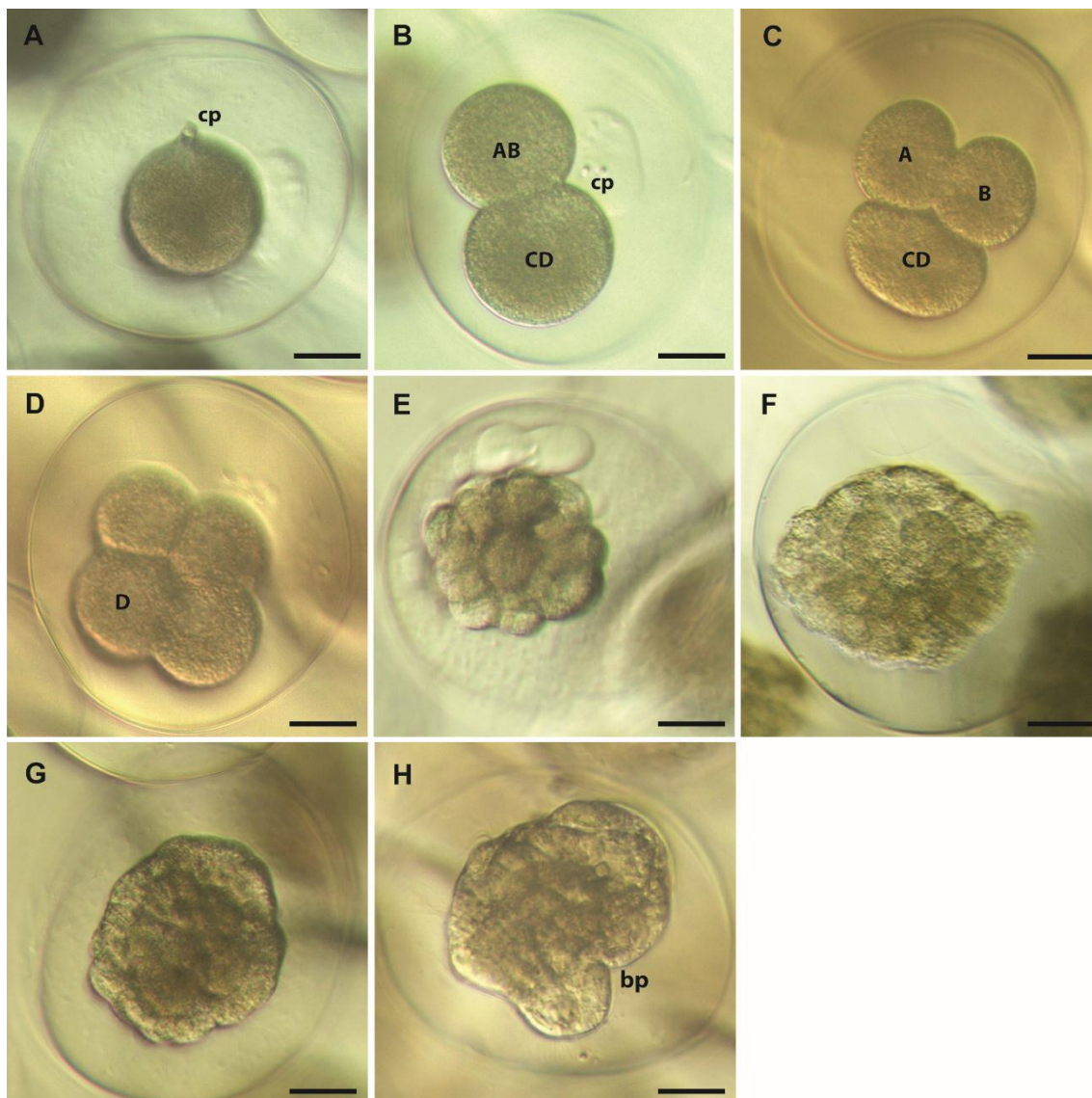


Figura 2. Desarrollo temprano de *E. diomedea*. (A) Embrión sin clivar, se puede observar la presencia de un cuerpo polar (cp) (0 hs). (B) Primer clivaje, se observa a los cuerpos polares (cp) separados del embrión (1,4 h) (C) Estadio transitorio de tres células; se observan los blastómeros A y B que se han dividido por completo y el blastómero CD que permanece sin dividirse (1,4 – 2 hs) (D) Segundo clivaje, se puede observar que el blastómero D (cabeza de flecha) es la célula más grande y se encuentra en contacto con los tres blastómeros restantes (1½ - 2 hs). (E) Estadio de múltiples células (5 – 6 hs). (F) 32 a 64 células. (G) Blástula tardía – gástrula temprana; las células han perdido definición y se observan más aplanadas (23.5 hs). (H) Gastrulación por epíbole, el embrión presenta forma de corazón y se observa la hendidura del blastoporo (bp) (4 días). Barra de escala 25 μ m

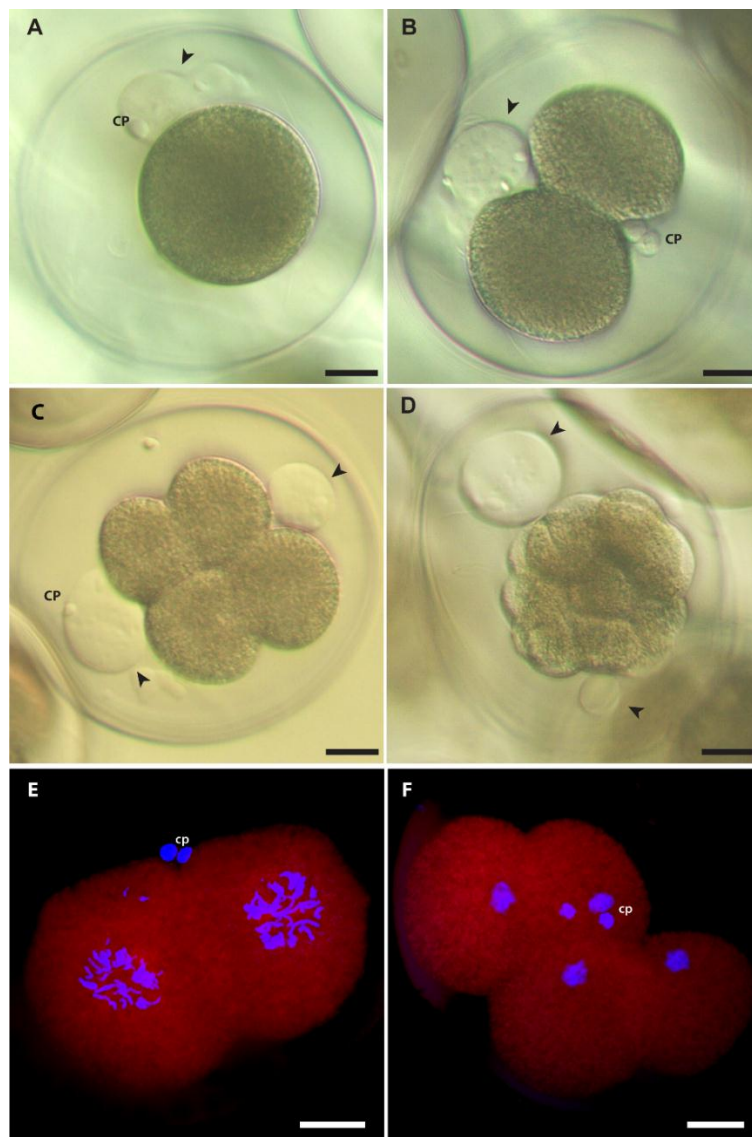
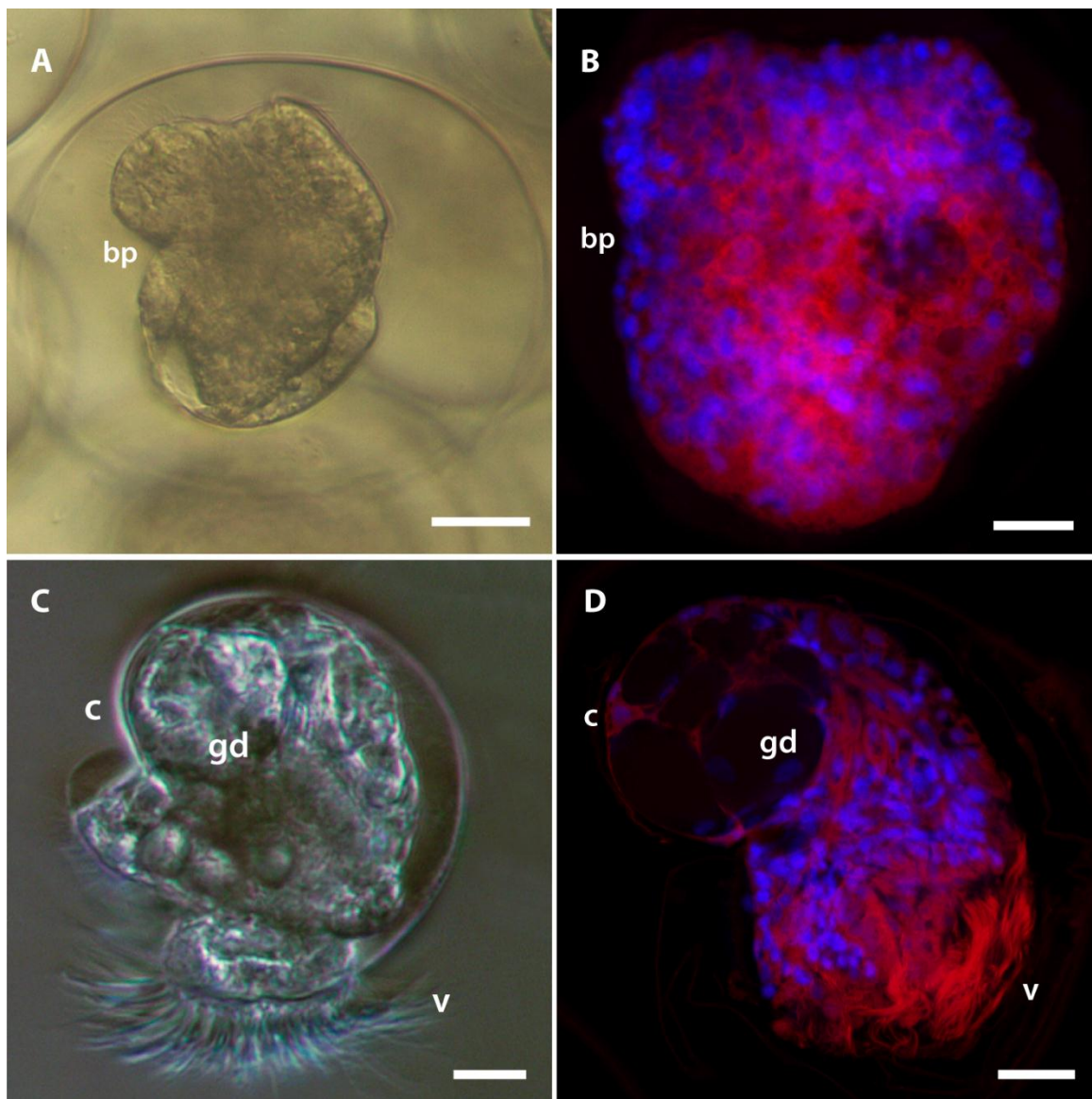


Figura 3. Estadios tempranos de *E. diomedea* con cuerpos polares y estructura anexa. (A) Embrión sin clivar, se observa estructura anexa semejante a una burbuja (cabeza de flecha) y dentro de la misma se encuentran los cuerpos polares (cp). (B) Primer clivaje, se pueden observar dos cuerpos polares en la estrangulación de las dos células, y la estructura anexa en el extremo contrario. (C) Segundo clivaje, se observan dos estructuras anexas, una a cada lado del embrión y dentro de una de ellas se observa un posible cuerpo polar (cp). (D) Estadio de 32 a 64 células, se observan dos estructuras anexas, en este caso no se encuentran frente a frente y una de ellas es de mayor tamaño. Barra de escala 20 μm . (E) Primer clivaje, se observa a los cuerpos polares (cp) apoyados en la división de las células. Además, se observa a los cromosomas dividiéndose. (F) Segundo clivaje, se observa a los cuerpos polares. Los filamentos de actina se muestran en rojo (*Phalloidin*) y los núcleos y cuerpos polares en azul (DAPI). Barra de escala 25 μm .



Figuro 4. Gástrula y larva de *E.diomedea*. (A y B) Gástrula. (A) El embrión aún presenta forma de corazón aunque está empezando a elongarse; se observa claramente el blastoporo (bp). (B) se puede observar que la mayoría de células se encuentran en la superficie del embrión y se identifica la hendidura del blastoporo. (C y D) Velíger eclosionada, se identifica la concha (c) y manto velar (v) y la glándula digestiva (gd). Los filamentos de actina se muestran en rojo (*Phalloidin*) y los núcleos y cuerpos polares en azul (DAPI). Barra de escala: A y C 20 μ m; B y D 25 μ m.

Figura 5. Reconstrucción filogenética para el género *Elysia*. La topología y las longitudes de las ramas corresponden al análisis de máxima verosimilitud de secuencias de ADN concatenados (1116 pb en total) que representan porciones de dos genes mitocondriales (COI, 16S). Los valores de probabilidad a posteriori se dan como porcentajes de bootstrap (arriba de las ramas) y probabilidades posteriores (debajo de las ramas). Los valores ausentes indican valores por debajo de 50 (bootstrap) o 0.5 (probabilidad posterior). Los códigos de acceso GenBank aparecen detallados en la tabla 2.

11. TABLAS

Tabla 1. Localidades de colecta, fechas y número de especímenes y puestas examinados de *Elysia diomedea*.

Localidad	Latitud, longitud	Fecha de colecta	Número de especímenes fijados	Fecha de colecta	Número de especímenes vivos	Número de puestas obtenidas
Ballenita	2° 12 21.4 S, 80 ° 52 50.98 W	01/2018	5	01/2018	10	6
Cabuya	0° 02 58.83 S, 80° 08 35.59 W	02/2018	2	05/2018	7	-
Mompiche	0° 30 25.63 N, 80° 01 47.66 W	02/2018	10	05/2018	14	-

Tabla 2. Número de acceso de GenBank para las secuencias de ADN utilizadas en los análisis filogenéticos.

Código muestra	Especie	Código genbank 16S	Código genbank COI
0001	<i>Elysia pusilla</i>	-	JQ914593.1
0014	<i>Elysia pusilla</i>	-	JQ914606.1
01Jap04	<i>Plakobranthus sp. blue</i>	-	KC573714.1
02Jap01	<i>Elysia atroviridis</i>	KM204223.1	KC573760.1
04Jap01	<i>Plakobranthus sp. black</i>	KM204278.1	KC573718.1
04Jap02	<i>Elysia pusilla</i>	JN819152.1	-
04SSal02	<i>Elysia buanoi</i>	JQ914621.1	-
04Swe04	<i>Elysia patina</i>	JN819145.1	JN819108.1
05Ire01	<i>Elysia viridis</i>	KM204254.1	KM086403.1
05Jap01	<i>Elysia sugashimae</i>	KM204251.1	M086399.1
05SD01	<i>Elysia hedgpethi</i>	KM204230.1	KM086380.1
06FL01	<i>Elysia crispata</i>	JN819139.1	JN819090.1
06Jam001	<i>Elysia marcusii</i>	KM204234.1	KM086384.1
06Jam0001	<i>Elysia ornata</i>	JN819132.1	JN819093.1
06Jam01	<i>Elysia cornigera</i>	JN819125.1	JN819084.1
06Jam03	<i>Elysia subornata</i>	JN819135.1	JN819111.1
06Lee03	<i>Elysia serca</i>	KM204248.1	-
06Mas01	<i>Elysia chlorotica</i>	KM204226.1	KM086377.1
06MUS01	<i>Elysia flava</i>	KM204229.1	-
06NZ01	<i>Elysia maoria</i>	KM204233.1	KM086383.1
06Tar01	<i>Elysia papillosa</i>	KP187840.1	KP187843.1
06Van01	<i>Elysia asbecki</i>	KM204200.1	-
07Aus001	<i>Elysia stylifera</i>	GU191046.1	-
07Aus01	<i>Elysia pusilla</i>	JN819151.1	-
07Aus03	<i>Elysia australis</i>	JN819142.1	JN819109.1
07BLR03	<i>Elysia diomedea</i>	KM204228.1	KM086379.1
07Jap01	<i>Elysia abei</i>	JN819137.1	KM086374.1
07Pla04	<i>Elysia pratensis</i>	KM204237.1	JN819112.1
07Swe01	<i>Elysia zuleicae</i>	JN819146.1	JN819105.1
0845	<i>Elysia translucens</i>	HM187602.1	HM187631.1
08Jap01	<i>Elysia rufescens</i>	KM204247.1	KC573688.1
09Gua01	<i>Elysia degeneri</i>	KM204227.1	KM086378.1
09Gua01	<i>Elysia mercieri</i>	-	KM086385.1
09Gua06	<i>Plakobranthus sp. blue</i>	KM204279.1	-

Tabla 2. Número de acceso de GenBank para las secuencias de ADN utilizadas en los análisis filogenéticos (continuación...)

Código muestra	Especie	Código genbank 16S	Código genbank COI
10Dry01	<i>Elysia canguzua</i>	KM204225.1	-
10Jap001	<i>Elysia thompsoni</i>	KM204252.1	JN819088.1
10Jap01	<i>Elysia minima</i>	KM204235.1	KM086386.1
10Npr01	<i>Elysia ellenae</i>	JN819141.1	-
10TAA4	<i>Elysia amakusana</i>	AB759025.1	-
11How02	<i>Elysia furvacauda</i>	KM204218.1	-
11Maui01	<i>Elysia lobata</i>	KM204232.1	KM086382.1
BC3471	<i>Elysia asbecki</i>	-	KM086360.1
CPIC00842	<i>Elysia orientalis</i>	KP187839.1	KP187842.1
Ea703LI	<i>Elysia amakusana</i>	EU140851.1	GQ996686.1
Eb779Sa	<i>Elysia bennettae</i>	EU140868.1	-
EBE2	<i>Elysia bennettae</i>	DQ480183.1	DQ471216.1
EBE3	<i>Elysia bennettae</i>	-	DQ471217.1
ECA2	<i>Elysia canguzua</i>	-	DQ471218.1
ECA3	<i>Elysia canguzua</i>	DQ480196.1	DQ471219.1
ECA4	<i>Elysia canguzua</i>	-	DQ471220.1
ECL	<i>Elysia chlorotica</i>	-	DQ471221.1
ECL24	<i>Elysia chlorotica</i>	DQ480200.1	-
ECL4	<i>Elysia chlorotica</i>	DQ471222.1	-
ECR37	<i>Elysia crispata</i>	DQ480199.1	-
ECR42	<i>Elysia crispata</i>	-	DQ471223.1
ECR46	<i>Elysia crispata</i>	DQ480198.1	DQ471224.1
Eham02Jap01	<i>Elysia hamatani</i>	JN819143.2	JN819110.1
Em726Su	<i>Elysia macnaei</i>	EU140854.1	-
ENI1	<i>Elysia nigrocapitata</i>	DQ480175.1	DQ471226.1
ENI2	<i>Elysia nigrocapitata</i>	-	DQ471227.1
ENI3	<i>Elysia nigrocapitata</i>	-	DQ471228.1
EOB	<i>Elysia obtusa</i>	DQ480182.1	-
EOB1	<i>Elysia obtusa</i>	-	DQ471259.1
EOR3	<i>Elysia ornata</i>	DQ480177.1	-
EOR4	<i>Elysia ornata</i>	DQ480178.1	DQ471261.1
EOR7	<i>Elysia ornata</i>	DQ480179.1	DQ471262.1
EOR8	<i>Elysia ornata</i>	DQ480180.1	DQ471263.1
EOR9	<i>Elysia ornata</i>	DQ480181.1	-
EPR	<i>Elysia pratensis</i>	DQ480162.1	-
09Jap01	<i>Elysia obtusa</i>	KM204236.1	KM086387.1
09Tha0001	<i>Elysia chilensis</i>	KM204209.1	KM086361.1
09Tha001	<i>Elysia leucolegnote</i>	KM204231.1	KM086381.1
09Tha01	<i>Elysia bangtawaensis</i>	KM204224.1	KM086375.1
09Tha02	<i>Elysia singaporensis</i>	KM204249.1	-

Tabla 2. Número de acceso de GenBank para las secuencias de ADN utilizadas en los análisis filogenéticos (continuación).

Código muestra	Especie	Código genbank 16S	Código genbank COI
EPR1	<i>Elysia pratensis</i>	-	DQ471258.1
EPU11	<i>Elysia pusilla</i>	DQ480201.1	-
ERU1	<i>Elysia rufescens</i>	DQ480171.1	DQ471237.1
ERU6	<i>Elysia rufescens</i>	DQ480172.1	DQ471238.1
Es710LI	<i>Elysia tomentosa</i>	EU140852.1	-
Es711LI	<i>Elysia tomentosa</i>	EU140853.1	-
ESE2	<i>Elysia setoensis</i>	DQ480163.1	DQ471239.1
ESE3	<i>Elysia setoensis</i>	-	DQ471240.1
ESE4	<i>Elysia setoensis</i>	-	DQ471241.1
ESR2	<i>Elysia serca</i>	-	DQ471242.1
ESR3	<i>Elysia serca</i>	DQ480192.1	DQ471243.1
ESR4	<i>Elysia serca</i>	-	DQ471244.1
ESU25	<i>Elysia subornata</i>	DQ480165.1	DQ471283.1
ETR1	<i>Elysia trisinuata</i>	DQ480174.1	-
Etri02Jap01	<i>Elysia trisinuata</i>	KM204253.1	KM086401.1
ETU13	<i>Elysia tuca</i>	DQ480186.1	-
ETU2	<i>Elysia tuca</i>	DQ480184.1	DQ471249.1
ETU25	<i>Elysia tuca</i>	-	DQ471250.1
ETU8	<i>Elysia tuca</i>	DQ480185.1	DQ471251.1
EVI	<i>Elysia viridis</i>	DQ480195.1	-
EVI3	<i>Elysia viridis</i>	-	DQ471211.1
TDI	<i>Elysia diomedea</i>	DQ480193.1	-
TDI1	<i>Elysia diomedea</i>	-	DQ471265.1
TDI2	<i>Elysia diomedea</i>	DQ480194.1	-
ZSM20033821	<i>Elysia macnaei</i>	-	GQ996689.1

Tabla 3. Características de la ovipositora de *Elysia diomedea*

Variable	Media
Longitud de la ovipositora ($N=5$)	35.2 ± 10.5 cm
No. de embriones por mm de puesta ($N=10$)	98 ± 9.21
No. de embriones por cápsula	1
Diámetro del embrión sin clivar ($N=20$)	62.06 ± 6.93 μm

Tabla 4. Estadios del desarrollo embrionario de *Elysia diomedea* a temperatura ambiente (12-29 °C).

Estadio embrionario	Tiempo
1 célula	0 h
1er clivaje	1.4 h
2do clivaje	1½ - 2 h
3er clivaje	5 - 6 h
Blástula	23.5 h
Gástrula	4 días
Trocófora	6 días
Larva sin eclosionar	10 días
Nacimiento	11 - 12 días

Los datos fueron compilados de la observación de 3 oviposturas.

12. ANEXOS

Anexo 1. Descripción soluciones utilizadas.

PBS

5x Buffer fosfatado

Para un volumen de la solución stock (5x) de 500 ml, a un pH 7.2-7.4, guardado a una temperatura de 4°C.

Na₂HPO₄·2H₂O 33.48 g

NaH₂PO₄·H₂O 7.93 g

PBT

Para un volumen de 50 ml. Guardado a una temperatura de 4°C.

PBS 0.1 M 49.85 ml

0.3 % Tritón X-100 0.15 ml

PFA

Fijativo de paraformaldehído en PBS al 4%

Para un volumen de 50 ml.

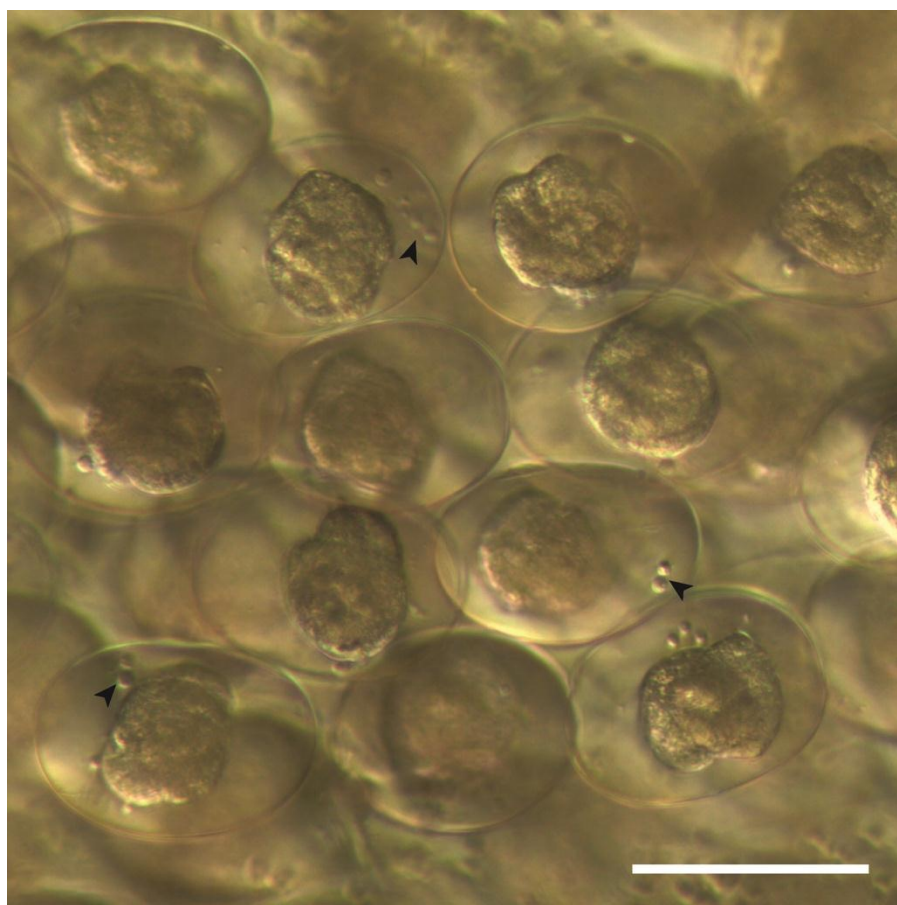
Formaldehído 37% 5.4 ml

PBS 0.1 M 44,59 ml

Anexo 2. Plataformas rocosas de las localidades: (A) Ballenita, (B) La Cabuya y (C) Mompiche.



Anexo 3. Embriones en estadio de gástrula con cuerpos polares (cabezas de flecha). Barra de escala 125 μ m



Anexo 4. Vista panorámica de estructura anexa en embriones de *Elysia diomedea*. (A) Primer clivaje. (B) Segundo clivaje. (C) Estadio de 32 a 64 células.

