

1. RESUMEN

La cleptoplastia, fenómeno por medio del cuál algunos sacoglosos secuestran los cloroplastos de las algas que ingieren y los mantienen funcionales dentro de una estructura digestiva especializada, ha sido estudiada ampliamente durante las últimas décadas. La capacidad que le brindan estos plastos a los sacoglosos les permite emplear los productos fotosintéticos como fuente de energía alterna, sobreviviendo así a periodos de escasez o ausencia de alimento.

La babosa fotosintética *Elysia diomedea* (Opisthobranchia: Sacoglossa), a diferencia de algunas especies congéneras, ha sido muy poco estudiada. Actualmente, se desconocen muchos aspectos sobre su ecología e historia natural. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue dilucidar factores importantes sobre su biología y comportamiento. Para esto, se desarrollaron experimentos en laboratorio donde se evaluaron las reacciones de esta especie bajo distintos tratamientos de dieta y tipos de iluminación.

Se emplearon cuatro especies de algas marinas: *Codium fragile*, *Ulva lactuca*, *Padina* sp. y *Pterocladia* sp., para analizar tiempos de supervivencia máxima y preferencia alimenticia. Además, se sometió a los individuos a periodos de inanición para evaluar su supervivencia. Se registraron cambios morfológicos y aspectos reproductivos como número de puestas y tiempos de eclosión.

Los resultados demostraron que la especie *E. diomedea* pudo ser mantenida exitosamente con luz artificial fluorescente. En privación de alimento la especie sobrevivió hasta 61 días. Finalmente, de las cuatro algas probadas, *Codium fragile* y *Padina* sp., resultaron ser las más adecuadas para ser ofrecidas como dieta de *E. diomedea* en cautiverio.

Palabras clave: Algas, cleptoplastia, Opisthobranchia, plastos, Sacoglossa.

2. ABSTRACT

Kleptoplasty, phenomenon by means of which some sacoglossa kidnap the plastids from the seaweed they feed on and they maintain them functional within a specialized digestive structure, has been studied widely during the last decades. The "kidnapped" plastids confer sacoglossa the capacity to use the photosynthetic products as an alternative energy source, thus surviving periods of shortage or food absence.

The photosynthetic slug *Elysia diomedea* (Opisthobranchia: Sacoglossa), unlike some congeneric species, has been poorly studied. Currently, many aspects on their ecology and natural history are yet unknown. Therefore, the objective of this investigation was to clarify important factors on its biology and behavior. Hence, experiments in laboratory were developed to evaluate the reactions of this specie under different treatments of diet and light regimes.

Four species of marine seaweed were used: *Codium fragile*, *Ulva lactuca*, *Padina* sp. and *Pterocladia* sp., in order to analyze times of maximum survival and diet preference. In addition, the individuals were submitted to periods of starvation to evaluate their survival. Morphologic changes and reproductive aspects such as number of egg masses and times of hatching were registered.

The results demonstrated that *E. diomedea* could be kept successfully alive with fluorescent artificial light. Under food deprivation the specie survived up to sixtyone days. Finally, above the four tested seaweed, *Codium fragile* and *Padina* sp., turned out to be the most optioned diet for *E. diomedea* in captivity.

Key words: Kleptoplasty, Opisthobranchia, plastids, Sacoglossa, seaweed.

3. INTRODUCCIÓN

El organismo sujeto de experimentación en el presente trabajo de tesis es *Elysia diomedea*, una especie de babosa marina que, al igual que sus parientes terrestres, está ubicada dentro del phylum Mollusca (clase Gastropoda). Ambos grupos secretan una mucosa que ha despertado gran interés científico, especialmente a nivel bioquímico (Davies-Coleman y Garson, 1998; Cueto *et al.*, 2005, Díaz-Marrero *et al.*, 2008; Astudillo y Soria, 2011).

La especie *E. diomedea* pertenece a un grupo muy singular, el de los Opisthobranchios, específicamente al orden Sacoglossa (Bergh, 1894; Marcus, 1982; Gosliner, 1995).

Comúnmente poseen dos pares de tentáculos, el segundo mucho más modificado, denominado rinóforo, que posee pliegues laminares que aparentemente aumentan la superficie quimiorreceptora. Todos son monoicos y su concha generalmente es reducida o ausente (Hickman *et al.*, 1999; Hickman, 2009).

Los Sacoglossa poseen una estructura bucal modificada conocida como rádula, la cual les permite succionar el citoplasma de las algas de las que se alimentan. Después de perforar el alga, los Sacoglossa extraen su citoplasma mediante una especie de bomba muscular ubicada en la faringe. El sistema digestivo está adaptado a una dieta de fluidos, con una larga superficie de absorción y un intestino reducido (Jensen, 1980; Jensen, 1991; Jensen, 1993a; Marin y Ros, 2004).

Poseen una glándula digestiva muy ramificada y especializada que se extiende a lo largo y ancho del cuerpo. Esta glándula es la estructura que les confiere a los sacoglosos la capacidad de desarrollar su mas notable cualidad, la de albergar cloroplastos. La habilidad de retener los cloroplastos en la glándula digestiva se la

conoce como “simbiosis de cloroplastos”, “cleptoplastia” o “retención de cloroplastos” (Kawaguti y Yamasu, 1965; Trench *et al.*, 1969; Muscatine y Greene, 1973; Hinde y Smith, 1975; Trench, 1975; Williams y Cobb, 1989; Mujer *et al.*, 1996; Pierce *et al.*, 1999; Rumpho *et al.*, 2000; MacFadden, 2001; Muniain *et al.*, 2001; Rumpho *et al.*, 2001; Marin y Ros, 2004; Giménez-Casalduero y Muniain, 2006; Evertsen y Johnsen, 2009; Händeler *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2010; Pelletreau *et al.*, 2011; Wägele *et al.*, 2011).

Algunas especies de sacoglosos tienen la habilidad no sólo de retener los cloroplastos secuestrados de las algas de las que se alimentan, sino también de mantenerlos funcionales, de manera que son capaces de realizar fotosíntesis como una fuente de energía alterna (Taylor, 1968; Trench *et al.*, 1969; Greene, 1970; Hinde y Smith, 1975; Clark y Busacca, 1978; Muniain *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2006; Evertsen *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2010; Middlebrooks *et al.*, 2011).

Además, otra cualidad que poseen estos asombrosos animales es la de tomar los metabolitos secundarios presentes en las algas o sintetizarlos a partir de los plastos adquiridos por endosimbiosis (Ireland y Scheuer, 1979; Koreeda y Akagi, 1980; Ireland y Faulkner, 1981; Cueto *et al.*, 2005). Al parecer la síntesis de estos metabolitos secundarios tiene un rol ecológico muy importante debido a que provee a los Sacoglossa un tipo de defensa química contra sus predadores (Cimino y Ghiselin, 1998; Gavagnin *et al.*, 2000; Becerro *et al.*, 2001; Fontana *et al.*, 2001).

Estudios realizados sobre la evolución del grupo demuestran que la defensa química evolucionó mientras permanecía presente la defensa mecánica (concha). Por lo visto, la defensa química fue una clase de “preadaptación” que hizo posible que la concha fuera reducida (Cimino y Ghiselin, 1998).

Todas estas evidencias han convertido a los Sacoglossa en sujetos de estudio de gran interés para la ciencia, especialmente en lo que respecta a fenómenos como evolución paralela, radiación adaptativa, características ecológicas relacionadas a su hábitat y finalmente su gran potencial bioquímico activo (Hay *et al.*, 1989; Cimino y Ghiselin, 1998).

3.1 *Elysia diomedea*

3.1.1 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS

Elysia diomedea difiere de otras especies del mismo género en que ésta posee un patrón de líneas blancas y negras que bajan por los rinóforos hacia la cabeza. Los rinóforos se extienden cada uno independientemente del otro, mientras la babosa se arrastra (Bertsch y Smith, 1973) (Figura 1).

Además, tiene puntos turquesa en su parte dorsal y puntos color naranja o rojo en los bordes de los propodium, que son rugosidades laterales que se extienden en la parte dorsal, estas estructuras son características de la familia Elysiidae, en el caso de *E. diomedea* son sumamente plegados (Figura 1A).

El cuerpo tiene un color que varía de verde claro a muy oscuro. Posee líneas en la región lateral de su cuerpo color amarillas o blanquecinas y translúcidas.

Generalmente los adultos alcanzan tamaños de entre 30 y 70mm de largo y tienen una sola vesícula espermática (Marcus, 1982)(Figura 1C).

Los plastos que obtiene de las algas marinas son almacenados en las células de una glándula digestiva (divertículo digestivo), la misma que se ramifica hacia el pie de la babosa, dejando pequeños parches de color verde (Händeler, 2010).

3.1.2 ASPECTOS TAXONÓMICOS

La primera descripción de esta especie fue realizada por Bergh en el año 1894; en ésta, él coloca a la especie *Elysia diomedea* dentro del género *Tridachia* junto con su especie hermana del Caribe denominada *Tridachia crispata*. Bergh sugería que hubo especiación alopátrica entre las especies *Tridachia crispata* y *Tridachia diomedea* a partir de una ancestro común.

Adicionalmente, Mac Farland en un estudio publicado en 1924 separa a *E. diomedea* del género *Tridachia*, colocándola dentro del subgénero *Tridachiella*, debido principalmente a la presencia de una hendidura en la parte anterior que separa los propodium.

Sin embargo, estudios filogenéticos más recientes acerca de los Elysidos demuestran que todas las otras especies colocadas dentro de esta familia poseen los propodium separados en su parte anterior (Gosliner, 1995). En base a las características filogenéticas, fisonómicas y fisiológicas analizadas, en el mencionado estudio se concluyó que los géneros *Tridachiella*, *Tridachia*, *Elysiellay* *Pattyclaya* deberán considerarse sinónimos de *Elysia*, pues es el grupo más antiguo, inclusivo y monofilético (Gosliner, 1995).

3.1.3 BIOLOGÍA

La especie de babosa marina *Elysia diomedea*, pertenece al grupo Sacoglossa, caracterizado por retener los cloroplastos secuestrados por el alga marina de la que se alimenta, de manera que pueden realizar fotosíntesis en sus propios tejidos.

Evidencias de estudios moleculares, inmunológicos y farmacológicos establecen que existen genes presentes en el ADN de los sacoglosos fotosintéticos, que codifican para proteínas de cloroplastos (Pierce *et al.*, 1999; Rumpho *et al.*, 2000; Hanten *et al.*, 2001; Pierce *et al.*, 2003). Este sorprendente hecho sugiere que en algún momento de la evolución debió ocurrir una transferencia génica horizontal entre el núcleo del alga y el de la babosa.

La manera en la cual dicha transferencia génica se llevó a cabo es todavía desconocida; no obstante, se ha propuesto una hipótesis que sostiene que el responsable de ésta, es un retrovirus que se expresa anualmente en las babosas (Pierce *et al.*, 1999).

El proceso de energía alternativa que obtiene esta especie, a partir de la fotosíntesis, se conserva activo durante todo el tiempo en que los plastos adquiridos se mantengan funcionales.

Se ha verificado mediante algunas investigaciones, dentro de las que resalta la realizada por Robert Trench y sus colegas en el año de 1969 (Trench *et al.*, 1969), que la especie *E.diomedea* posee plastos en las células del divertículo digestivo; estos plastos son fotosintéticamente funcionales, pues se demostró experimentalmente que pueden fijar CO₂ y liberar productos fotosintéticos al tejido animal. El mismo estudio determinó que dichos plastos pueden conservarse funcionales por al menos seis semanas después de que las babosas han permanecido aisladas de una fuente de alimento.

La simbiosis entre los cloroplastos del alga y la babosa de mar, cleptoplastia, se refiere a que el animal es el total beneficiario de esta asociación.

Se ha observado que esta especie es muy activa en horas de la mañana, un individuo de 46 mm se desplaza en un promedio de 9,5cm/min (Bertsch y Smith, 1973).

3.1.4 METABOLITOS SECUNDARIOS

Elysia diomedea carece de una concha protectora externa, por lo que, al igual que otros miembros de su grupo, utiliza químicos tóxicos o nocivos como mecanismo contra los predadores, que se cree provienen del alga de la que se alimentan (Ireland y Faulkner, 1981).

El carbono fijado en el organismo de la babosa, como consecuencia de la fotosíntesis de sus plastos, aparece en forma de una variedad de metabolitos primarios incluyendo azúcares y lípidos (Davies-Coleman y Garson, 1998).

En especies como *Elysia diomedea* se ha observado que estas sustancias de defensa se producen al unir algunos propianatos propios con aquellos derivados de la dieta. Esta unión conduce a la formación de un anillo α -methoxy- γ -pirona. (Davies-Coleman y Garson, 1998; Cueto *et al.*, 2005; Díaz-Marrero *et al.*, 2008).

Los metabolitos secundarios policíclicos que se han identificado en *Elysia diomedea*, derivados de la formación de un polipropianato, se denominan Elysiapironas. Algunos estudios sobre estos compuestos han determinado que pueden reducir el daño que sufren los plástidos simbioses por la intensidad lumínica, confiriéndoles ventajas en las respuestas adaptativas de *E. diomedea* (Cueto *et al.*, 2005).

Muchos científicos han enfocado sus esfuerzos en el estudio de la especie de babosa marina *Elysia diomedea*, por el interés que existe en sus metabolitos secundarios, especialmente para la industria farmacéutica.

Los polipropianatos producidos por la especie en estudio (*E. diomedea*) continúan siendo investigados; sin embargo, se espera que posean una composición química que pueda actuar en contra de varias enfermedades, especialmente de carácter cancerígeno, pues se ha comprobado que algunos polipropianatos derivados de su pariente más cercano del Caribe, *Elysia crispata* (= *Tridachia crispata*), tienen actividad contra la leucemia linfocítica (Mohamad, 1985). Adicionalmente, otro de los miembros de este género, *Elysia grandifolia*, ha sido sujeto de experimentación y se verificó que produce compuestos citotóxicos que tienen características antimicóticas (Bhosale *et al.*, 1999).

3.1.5 DISTRIBUCIÓN

La localidad tipo, es decir el lugar donde fue encontrada la especie por primera vez, es la costa de la Isla Cerralvo (24°11'N, 109°55'O) en Baja California, México (Bergh, 1894).

De acuerdo a los registros publicados sobre *Elysia diomedea*, se conoce que esta especie se distribuye a lo largo de la costa este del pacífico en América, desde el sur de los Estados Unidos hasta Perú (Trench *et al.*, 1969; Bertsch y Smith, 1973; Terán *et al.*, 2004; Jensen, 2007; Nakamura, 2007; Barraza, 2009; Beherens *et al.*, 2010; Anexo 1 y 2).

La mayoría de estudios sobre la biogeografía de *E. diomedea* han sido efectuados en Estados Unidos y México. Algunos investigadores mencionan que esta

especies uno de los opistobranquios más comunes en el Golfo de California (Rudman, 2010); sin embargo, un estudio realizado en Baja California durante diez años, demostró que ha existido una disminución abrupta en su densidad poblacional. Se cree que probablemente esta declinación puede deberse a las variaciones termo-hidrográficas, cambios en la densidad de algas o calidad de hábitat; también existe la posibilidad de que sea un ciclo normal de la población, este aspecto ecológico de *E. diomedea* aún no ha sido dilucidado (Bertsch, 2007).

3.1.6 HÁBITAT

Las babosas marinas *Elysia diomedea* se caracterizan por habitar principalmente las zonas intermareales y en ocasiones submareales, hasta aproximadamente 20m de profundidad (Rudman, 2003).

Al bajar la marea, se divisan en pequeñas charcas o grietas con presencia de abundantes algas, no así en aquellas pozas grandes donde sólo se encuentra arena. Generalmente se las encuentra en asociación con erizos de mar (obs. pers.).

3.1.7 DIETA

En lo que respecta a la dieta de los miembros de la familia Elysiidae, el grupo ha desarrollado la capacidad de variar su fuente original de alimento, dando paso a una radiación adaptativa, la cual dependerá en gran parte de las nuevas oportunidades y las condiciones que se tengan para conseguir el nuevo alimento (Cimino y Ghiselin, 1998).

En los Sacoglossa aparentemente uno de los factores importantes para variar la dieta puede ser la oportunidad de alimentarse de otras algas de las que puedan extraer sus metabolitos y utilizarlos como defensa (Cimino y Ghiselin, 1998).

El único reporte que se tiene sobre la dieta de *Elysia diomedea* proviene de la investigación efectuada por Bertsch y Smith (1973), donde mencionan que en condiciones de experimentación se observó que las babosas se alimentaban del alga *Padina* sp., mientras que en el campo algunas fueron encontradas viviendo en las hojas de *Spyridia filamentosa*. Adicionalmente, en el mismo reporte se menciona que uno de sus colaboradores tuvo la oportunidad de observar a *E. diomedea* alimentarse de *Padina* sp., en las pozas rocosas de Puerto Peñasco, Sonora, México.

A partir del reporte antes mencionado, poco o nada se conoce sobre la dieta de *Elysia diomedea*, especialmente en Ecuador, siendo este un aspecto de su ecología y dinámica que puede ser ampliamente estudiado, pues existen muchas interrogantes que aún no han sido dilucidadas.

3.1.8 REPRODUCCIÓN Y CICLO DE VIDA

Algunas investigaciones sobre el ciclo de vida y reproducción de *Elysia diomedea* han reportado que esta especie, al igual que muchos de sus parientes cercanos, posee desarrollo planctotrófico, es decir presentan pequeños embriones que son empaquetados y agrupados conjuntamente dentro de una estructura de forma espiral (Figura 2).

No existen estudios exactos pero algunos científicos calculan, en base al desarrollo observado en especies congéneras, que la larva tarda aproximadamente

un mes en llegar a la etapa de metamorfosis, siempre y cuando se haya alimentado de algas microscópicas. De acuerdo a observaciones efectuadas por criadores de moluscos, aparentemente *Elysia diomedea* presenta un tipo de larva velígera (Rudman, 2006).

Existe un solo registro que indica el sustrato sobre el cual estas babosas colocan sus puestas. En este estudio se menciona que los individuos mantenidos en cautiverio depositaron sus huevos sobre el alga *Padina* sp. y sobre la pared de las peceras, preferentemente. Se determinó que en una puesta de aproximadamente 2mm de diámetro se encontraron cerca de 14 a 16 cápsulas densamente empaquetadas, cuatro cápsulas analizadas contenían 6, 12, 13 y 14 embriones (Bertsch, 1973).

Como se menciona anteriormente, los Sacoglossa han desarrollado un método de alimentación por medio del cual succionan el citoplasma de las algas, gracias a una modificación en su rádula que les permite perforar las paredes de las células de las algas. Este fenómeno ha conducido a que la mayoría de Sacoglossa se alimente de algas sifonales (Orden:Siphonal) las cuales poseen una gran célula sin tabiques con uno o varios núcleos (sincitiales), este tipo de algas realizan divisiones nucleares repetitivamente sin formar paredes celulares, por lo que son unicelulares pero multinucleares (cenocíticas) (Barsanti y Gualtieri, 2006).

3.2 ESPECIES DE ALGAS EMPLEADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN

3.2.1 CODIUM FRAGILE

Es una especie perteneciente al grupo de las Chlorophyceae o algas verdes. Es un alga ramificada de consistencia similar a una esponja. Generalmente se

encuentra en pozas profundas de las playas rocosas. Esta especie específicamente habita en aguas templadas y su tamaño generalmente es de hasta 30 cm; sin embargo, en ocasiones puede alcanzar hasta 1m (Greene, 1998).

Codium fragile es una especie de alga que habita siempre sobre un sustrato, sea esto roca, conchas u otros (Greene, 1998; Figura 3A).

3.2.2 *Ulva lactuca*

Es una especie de alga verde. A este género normalmente se lo conoce como lechuga de mar, debido a su forma y consistencia. Tiene una gran importancia en términos ecológicos pues al morir se descompone y sus nutrientes son luego aprovechados por el plancton, así también algunos organismos como los moluscos pueden filtrar estos nutrientes. Varios estudios han demostrado que este género de alga es uno de los mayores productores de oxígeno dentro del grupo (Greene, 1998; Antizar-Ladislao y Turrion-Gomez, 2010; Figura 3B).

Adicionalmente, se ha comprobado que *Ulva* tiene la capacidad de realizar fotosíntesis fuera del agua, mediante un método pasivo por medio del cual toma el CO₂ directamente del agua y alternativamente es capaz de captar dióxido de carbono en forma de bicarbonato (Reef Central Group, 2009).

3.2.3 *Padina* sp.

Esta especie pertenece al grupo de las Phaeophyceae o algas pardas. Posee un talo erecto con rizoides. Tienen una apariencia de racimo, cada uno de sus segmentos puede alcanzar de 1-5cm de ancho, el alga entera llega a tener hasta 20cm de largo (Guiry y Guiry, 2010).

Es una especie cosmopolita en playas templadas y tropicales. Se la encuentra normalmente adherida a sustratos o en pozas arenosas de playas intermareales especialmente rocosas (Enciclopedia Británica Group, 2010; Figura 3C).

3.2.4 *Pterocladia* sp.

Pertenece al grupo de algas rojas o Rhodophyceae. Las algas rojas son las más abundantes y valoradas comercialmente. Se encuentran normalmente en la zona intermareal y submareal de las playas rocosas. Los pigmentos que presentan este tipo de alga le permiten realizar fotosíntesis a profundidades mayores que otras algas, pues no requieren de mucha luz. Posee un talo cartilaginoso ramificado (Guiry y Guiry, 2010; Figura 3D).

Los datos hasta aquí expuestos ponen en evidencia la necesidad de realizar más estudios, que permitan dilucidar aspectos desconocidos sobre la biología e historia natural de la especie *Elysia diomedea*, identificando las relaciones y ventajas, tanto ecológicas como evolutivas, que brinda el elegir un tipo determinado de hábitat y dieta.

Considerando esta necesidad, los experimentos fueron diseñados con la finalidad de definir cuáles son las especies de algas que constituyen la dieta de las babosas y cómo ésta se relaciona con la actividad fotosintética y en consecuencia con su supervivencia.

Así también, se espera que este estudio facilite la investigación de las sustancias bioactivas (metabolitos secundarios) que la especie produce, al determinar los requerimientos ambientales y energéticos básicos y las condiciones

óptimas necesarias para establecer criaderos donde estos especímenes sean estudiados según los campos de interés.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la relación ecológica existente entre la cleptoplastia y el tipo de dieta en *Elysia diomedea* como factores determinantes para su supervivencia.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la influencia de la luz en el comportamiento y supervivencia de *E. diomedea*, exponiendo a los individuos a distintos tipos de luz.
- Estimar el periodo de retención de plastos en base al análisis de supervivencia bajo condiciones de inanición.
- Determinar la supervivencia máxima de las babosas marinas *Elysia diomedea* en relación al tipo de dieta, restringiendo su alimentación a cada especie de alga de manera independiente.
- Establecer la dieta preferida por *E. diomedea* entre varias opciones de algas ofrecidas, mediante registros de permanencia y evidencias de forrajeo.
- Identificar cambios morfológicos y de comportamiento durante procesos de inanición y alimentación.
- Registrar los procesos reproductivos observados en *E. diomedea*, analizando la posible relación con su dieta.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

4.1.1 LOCALIDAD 1: SALINAS

La mayoría de los individuos estudiados provienen de las playas rocosas del Sur de Salinas (80°58'45"W y 2°11'56"S), Península de Santa Elena, Provincia de Guayas. El sector específico donde se colectaron los especímenes es San Lorenzo en un área conocida como "El Barco Hundido". En este sector se desarrollan actividades de turismo, buceo y pesca artesanal (Anexo 3).

Las playas de Salinas están constituidas por una amplia extensión de zona intermareal, donde al bajar la marea quedan expuestos gran cantidad de micro-hábitats ocupados por peces, invertebrados marinos y distintas especies de algas (Figura 4 y Anexo 4).

Al encontrarse las playas de Salinas dentro de una zona de gran desarrollo turístico, la influencia antrópica es muy alta, presentándose amplias variaciones en el hábitat natural de *Elysia diomedea*, tales como la presencia de distintos tipos de desechos sólidos (recipientes de plástico, papeles, etc.), desechos líquidos (aceites u otros combustibles, aguas negras, etc.), entre otros.

El clima en esta zona costera está determinado por dos épocas, la seca y la lluviosa. Durante la época seca o no lluviosa que comprende los meses de Mayo a Noviembre-Diciembre, hay una influencia de la corriente fría de Humboldt que viene desde el sur del país y la temperatura superficial del mar puede variar entre los 21°C a 25°C aproximadamente. En la época lluviosa que puede iniciarse a fines de

Diciembre hasta abril aproximadamente, la costa de Salinas recibe aguas cálidas provenientes del norte y la temperatura puede variar entre los 25° C a 28°C aproximadamente (Hernández, 2005-2006, Riofrío y Chavarría, 2004)

4.1.2 LOCALIDAD 2: TONGORACHI

Las playas de Tongorachi (79°56'53"W y 0°50'0"S) se encuentran ubicadas en el cantón Muisne, Provincia de Esmeraldas (Anexo 5). Es un área muy poco intervenida, pues al estar sus playas ubicadas entre dos grandes acantilados, su único acceso es a través de una zona de bosque húmedo que es de propiedad privada; por tanto, en el lugar no se efectúan actividades de turismo o pesca y su estado natural se encuentra altamente preservado. El tipo de roca presente es una especie de arenisca, fácil de penetrar, lo que permite el alojamiento de gran cantidad de especies, destacándose entre estas una gran variedad de diminutos crustáceos (Figura 5).

En el experimento piloto, que permitió determinar las especies más tolerantes a experimentación en cautiverio, se emplearon individuos tanto de la localidad de Salinas como de Tongorachi; no obstante, la población de Salinas fue seleccionada para estudiar la mayoría de procesos involucrados en la dieta, endosimbiosis y comportamiento reproductivo de *Elysia diomedea*.

4.2 ASPECTOS METODOLÓGICOS GENERALES

4.2.1 TÉCNICAS DE COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE BABOSAS MARINAS

La recolección de moluscos marinos, como es el caso de los Sacoglossa, puede efectuarse de varias maneras; el método más utilizado es el de recolección manual, mismo que se puede hacer mediante buceo o durante la marea baja.

Elysia diomedea tiene una distribución vertical desde las zonas intermareales hasta 20m bajo el nivel del mar (Bergh, 1894) y su hábitat consiste en zonas rocosas, por lo que la forma más eficiente de realizar la colección de individuos es durante la marea baja, ya que hay más terreno expuesto y se evitan los riesgos a los que el colector se expone cuando bucea en zonas de oleaje con presencia de rocas.

La recolección manual básicamente consiste en buscar bajo piedras, corales y en la arena. Es importante determinar la extensión y niveles de profundidad del área de muestreo de los especímenes.

Debe llevarse una bolsa o preferiblemente un recipiente plástico duro donde puedan colocarse los individuos junto con un volumen apropiado de agua de mar (Figura 6).

4.2.2 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE ALGAS MARINAS

Para las distintas fases de experimentación e investigación llevadas a cabo en este proyecto de tesis, fue necesaria no sólo la colección sino también el transporte y el mantenimiento de las algas bajo condiciones adecuadas.

Para mantener las algas en buen estado y promover su proliferación es necesario principalmente coleccionar lo que se llama “roca viva”, es decir aquella roca que contiene algas y otros organismos.

La colección de rocas vivas resulta mucho más eficiente para el cultivo de algas que la técnica de colecta por raspado, por medio de la cual se obtiene únicamente el alga, sin ningún tipo de sustrato, que es el que le ofrece muchos de los nutrientes al alga. La técnica de raspado es empleada más cuando se necesita un abastecimiento inmediato de alga, por ejemplo para experimentos de preferencia alimenticia (Tsuda y Abbot, 1985; Pizarro, 2003; Figura 7).

Al momento de la colecta y mantenimiento de las algas se debe tener la precaución de que éstas estén libres de organismos tales como micromoluscos, crustáceos, helmintos, etc., que generalmente pasan desapercibidos si no se observa con cuidado y que al morir generan niveles de toxicidad en el agua, produciendo como consecuencia la putrefacción de las algas.

Para aislar las algas del resto de los organismos se deben seguir los siguientes pasos:

- a) Partir el material (roca viva) en pedazos pequeños y ponerlo en un balde o bandeja con agua de mar.
- b) Raspar cuidadosamente con un cepillo las rocas, intentando remover la mayor cantidad de organismos “indeseables”.
- c) Dejar reposar la bandeja con la roca viva a la sombra; al irse acabando el oxígeno del agua, los organismos indeseados empezarán a subir por las paredes de la bandeja, permitiendo que las algas queden libres de estos.

4.2.3 ESTANDARIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA ENSAYOS DE LABORATORIO

En todos los casos se empleó agua de mar natural filtrada, pues en los primeros ensayos los individuos no se adaptaron al agua de mar artificial. Ésta fue tomada de las costas de Salinas y filtrada en los laboratorios de investigación biológica del Instituto Oceanográfico de la Armada (INOCAR).

Se procuró tomar el agua de las partes más profundas posibles (~ 4m), en ocasiones incluso empleando pequeñas embarcaciones, en horas de marea alta. Se emplearon garrafones plásticos para el transporte del agua.

Para mantener los acuarios en buenas condiciones experimentales debieron controlarse varios factores de los cuales dependen la calidad del agua y el balance de sus nutrientes.

Los factores que debieron controlarse fueron:

- a) **La evaporación:** Se emplearon tapas de vidrio para evitar la evaporación acelerada del agua y en consecuencia el incremento de la densidad y la concentración de sales. La tapa disminuye la evaporación, más no la impide; por lo tanto, en la misma medida que el nivel de agua disminuía debía ser repuesta con agua dulce reposada.
- b) **pH:** Por tratarse de agua salina el valor óptimo de pH debió controlarse en un rango de entre 8.0 y 8.4
- c) **La dureza:** El agua se mantuvo entre 10 y 19 grados de dureza (dKH).
- d) **Temperatura:** Se procuró mantener en los acuarios la temperatura del hábitat natural, la cual presenta fluctuaciones estacionales de entre 20 y 25°C.

- e) **Densidad:** La densidad del acuario marino es la relación que existe entre la cantidad de agua y la sal que ella posee. El nivel óptimo para los acuarios es de $1,022\text{g/cm}^3$, no obstante, los valores normales pueden fluctuar entre $1,021$ y $1,026\text{ g/cm}^3$.
- f) **Nitratos y nitritos:** Se colocó agua con rocas vivas (conteniendo invertebrados y algas) durante una o dos semanas antes del desarrollo de los experimentos para promover la nitrificación (Paletta, 2008) y evitar la intoxicación producida por la presencia de concentraciones altas de amoníaco en los primeros días del montaje de los acuarios. En consecuencia, los ensayos fueron desarrollados con agua filtrada nitrificada ($0,5\text{ mg/l}$).
- g) **Iluminación:** Se empleó en la mayoría de experimentos lámparas fluorescentes T5 FHE 96lm/w , controladas por un sincronizador automático temporal de encendido y apagado, mismo que fue regulado para un periodo de $12\text{h luz}/12\text{h oscuridad}$. Estas lámparas se emplean principalmente en acuarios con una profundidad menor a 45cm .
- h) **Oxigenación:** Para cada acuario se utilizó una bomba oxigenadora SOBO SB-248A de una sola salida, con una potencia de 4 l/min , a fin de crear un movimiento continuo en la superficie del acuario para facilitar el intercambio gaseoso entre la atmósfera y el agua.
- i) **Filtración:** Se usaron filtros biológicos de fondo BOYU 32P que fomentan la colonización por bacterias nitrificantes y se encargan de transformar los desechos orgánicos altamente tóxicos en compuestos más tolerables (Petracini, 2010; Anexo6).

La temperatura fue controlada por medio de termómetros, la densidad específica y la salinidad se calcularon empleando hidrómetros (Aquarium Systems Instant Ocean Hydrometer). Se utilizó un Test Kit de dureza total del agua (Hanna HI 3841 40-500 mg/l) para controlar la misma. Los parámetros químicos nitratos, nitritos, alcalinidad, amonio y el pH fueron controlados empleando bandas de medición (Mardel Saltwater Test Strips). El oxígeno fue medido utilizando kits de muestreo (Minilab Oxygen Test Kits).

La dimensión de los acuarios fue de 45 x 25 x 20cm, con un volumen de 22, 5 litros.

4.3 ASPECTOS METODOLÓGICOS ESPECÍFICOS

En general, las colecciones abarcaron un número reducido de individuos debido a que existe evidencia de que el muestreo continuo y localizado de las poblaciones de *Sacoglossa* tropicales, puede generar un notable decrecimiento de la densidad poblacional (Brandley, 1984; Waugh y Clark, 1986).

4.3.1 SUPERVIVENCIA Y COMPORTAMIENTO EN RESPUESTA A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ

Diseño experimental

El 16 de marzo de 2005 se colectaron tres individuos de la localidad de Salinas. Posteriormente, el 19 de agosto del año 2005 fueron colectados 33 individuos de la localidad de Tongorachi.

Para recrear el ambiente natural y mantener el equilibrio de los nutrientes en el agua, las peceras contenían rocas vivas con algas procedentes del lugar de

colección, entre ellas *Codium* sp., *Padina* sp., *Ulva* sp., y *Pterocladia* sp., mismas que fueron expuestas al sol sin oxígeno para promover la salida de animales no deseados como anélidos, crustáceos, moluscos, etc. (Barrientos, 2003).

Se colocaron dos acuarios en una habitación con cubierta de vidrio, lo cual permitió que las mismas se mantengan expuestas directamente al sol y tres acuarios en un cuarto oscuro iluminado por una lámpara de luz artificial (Figura 8). Los individuos fueron distribuidos en los acuarios como lo muestra la Tabla 1.

A fin de determinar el número adecuado de individuos que pueden ser mantenidos en condiciones de laboratorio dentro de un acuario mediano (45x20x25cm), se emplearon distintos tamaños de muestra en el número de individuos por acuario expuestos a luz artificial. Así también sería posible detectar alguna diferencia en el comportamiento y supervivencia de los individuos al estar mayormente agregados.

Análisis de datos

Para medir la incidencia del tipo de luz en la supervivencia de los individuos se registró el número de muertes por fecha, en cada acuario.

El tiempo medio de supervivencia de los individuos fue calculado mediante el análisis de Kaplan Meier, que es un método no paramétrico basado en los tiempos de observación para la ocurrencia de un fenómeno, el cual expresa la probabilidad de supervivencia individual, acumulada a lo largo del tiempo. Este análisis considera datos tanto de número de muertes como de censuras (terminación de experimento por causas indefinidas) (Rebasa, 2005).

Las curvas de supervivencia desplegadas fueron comparadas mediante la prueba *log-rank*².

Debido a la heterogeneidad del tamaño de muestra por tratamiento, se transformaron los valores en porcentajes de muerte, a fin de que los datos sean comparables.

Se realizó una ANOVA para identificar si existen diferencias entre los individuos dentro de cada grupo.

Adicionalmente, se aplicó la prueba estadística de Mann-Whitney para conocer si existe una diferencia significativa entre los tratamientos de distintos tipos de luz empleados.

4.3.2 SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES DE LUZ ARTIFICIAL

Diseño experimental

El 23 de agosto del año 2009 se colectaron 22 individuos de Salinas y se colocaron en un acuario, mantenido en condiciones ambientales controladas e iluminación artificial fluorescente, conteniendo roca viva y algas recogidas de su hábitat natural (Figura 9).

Se realizaron observaciones de los cambios morfológicos y de comportamiento.

Finalmente, para los análisis de supervivencia se tomaron registros del número de muertes ocurridas por fecha.

Análisis de datos

A fin de que los datos del presente experimento sean comparables con los del experimento anterior (supervivencia bajo distintas condiciones de luz), se transformaron los datos a porcentajes y se anotaron las variaciones en el número de muertes de los individuos en cada semana para ambos experimentos.

Adicionalmente, se calculo el tiempo medio de supervivencia de los individuos mediante el análisis de Kaplan Meier.

Los resultados de las curvas de supervivencia de los individuos expuestos a luz artificial en el experimento efectuado en el año 2005 fueron comparados con los del presente experimento mediante la prueba *log-rank*².

4.3.3 SUPERVIVENCIA EN INANICIÓN

Diseño experimental

El 20 de junio del 2007 se colectaron 90 individuos en la localidad de Salinas, mismos que fueron distribuidos en tres acuarios, cada uno con 30 individuos, con agua de mar natural filtrada, a fin de conservar las condiciones naturales de los nutrientes en el agua (Figura 10).

Los individuos fueron mantenidos en inanición hasta el día de su muerte, de tal forma que se establezca el número aproximado de días que puede sobrevivir una babosa de la especie *Elysia diomedea* bajo estas condiciones, asumiendo que su supervivencia depende en gran parte de las funciones fotosintéticas del proceso de endosimbiosis.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA, que permitió identificar si los resultados entre los días de supervivencia por individuos en los tres acuarios, presentaban o no diferencias significativas que pudieran estar relacionadas con algún efecto intrínseco en los acuarios.

Se estimó el valor medio de supervivencia de los individuos al estar desprovistos de una fuente de alimento.

4.3.4 SUPERVIVENCIA ANTE DISTINTOS TIPOS DE DIETA

Diseño Experimental

El día 21 de junio del 2007 se colectaron un total de 70 individuos en la localidad de Salinas, mismos que fueron divididos en dos acuarios con 35 individuos cada uno. Los individuos fueron mantenidos durante 40 días en inanición (Figura 11A). Corregir la figura 11 y aumentar pecera en periodo de inanición.

Posteriormente, se probaron tres tipos de dietas, las algas *Padina* sp., *Codium* sp. y *Pterocladia* sp., cada especie de alga fue colocada en un acuario independiente, en los cuales se distribuyeron 20 individuos por cada especie de alga.

Adicionalmente, se empleó a manera de control, un acuario sin algas con 10 individuos (Figura 11).

La supervivencia se determinó mediante los registros de muertes diarias.

Análisis de datos

Se estimaron los tiempos de supervivencia para cada tratamiento (tipo de alga ofrecida como alimento), mediante el análisis de Kaplan Meier.

Las curvas de supervivencia desplegadas fueron comparadas mediante la prueba *log-rank*².

Complementariamente, se realizó un ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Considerando que el tamaño de muestra entre el acuario control y el de los distintos tratamientos de dieta es diferente, los datos fueron transformados a porcentajes, a fin de que sean comparables.

4.3.5 PREFERENCIA ALIMENTICIA

Diseño experimental

El experimento fue diseñado en base a las metodologías empleadas en estudios similares sobre preferencia alimenticia (Thibaut *et al.*, 2001; Prince, 2004).

El día 11 de junio del 2010 se colectaron 18 individuos en las playas rocosas de Salinas, las babosas fueron mantenidas en inanición durante un periodo de 18 días, a fin de reducir la interferencia de algas consumidas por última vez en su hábitat. No se registraron muertes durante este periodo de tiempo.

Se prepararon tres peceras (A, B y C) bajo condiciones ambientales de temperatura, nutrientes y oxigenación normales.

Las peceras fueron divididas en tres secciones, por medio de dos mallas plásticas rígidas, que impedían el paso de las babosas pero que a la vez permitía la circulación del agua, manteniendo así las mismas condiciones en toda la pecera.

Se colectaron cuatro especies de algas del hábitat de las babosas, con la finalidad de identificar el grado de preferencia por alguna de ellas.

Las especies empleadas como tratamientos fueron: *Padina* sp., *Codium* sp., *Ulva* sp. y *Pterocladia* sp. Se colocó aproximadamente la misma cantidad de cada especie de alga, distribuyéndolas aleatoriamente en las esquinas de dos de las secciones de cada pecera, dejando una de las secciones, la intermedia, sin alimento, a fin de usarla como control.

Posteriormente, los animales fueron divididos en las tres peceras, colocándose dos individuos en cada una de las secciones. Así, como resultado se obtuvieron tres replicados de dos individuos control y tres replicados de cuatro, es

decir, doce sujetos experimentales expuestos a cuatro especies de algas diferentes, para evaluar si éstas son parte de su dieta.

Para distinguir los dos individuos de cada sección, se emplearon babosas de tamaños notoriamente distintos, asegurándose de que ambos sean adultos. Este tipo de marcaje ha sido empleado previamente de manera exitosa en otros experimentos con especies de *Sacoglossa* (Jensen, 1986).

Los animales se identificaron como 1. Tamaño grande (~8 cm) y 2. Tamaño mediano (~6 cm) y D. Sección derecha de la pecera e I. Sección izquierda de la pecera (Figura 12).

La preferencia de los individuos fue registrada en términos de tiempo de permanencia (minutos) sobre un alga específica.

Se dividió el experimento en tres fases o periodos de observación al día: I. en la mañana (8h00-14h00), II. en la tarde (14h00-19h00) y III. en la noche (19h00-22h00), con la finalidad de detectar la existencia de patrones de actividad en *E. diomedea*. Cada periodo de observación tuvo una duración de 40 minutos; la determinación de este tiempo estuvo basada en estudios similares sobre preferencia alimenticia en *Sacoglossa*, donde se estableció que fases de 30-70 minutos consecutivos de observación diarios son suficientes para reconocer signos de preferencia (Gianguzza *et al.*, 2002). A pesar de esto, para reforzar la validez de los resultados, se realizaron los tres periodos de observación antes descritos, para dar un total de 120 minutos (2 horas) diarios. El experimento fue realizado durante un lapso de 8 días.

Se registraron los datos individualmente a fin de probar si existe una correlación entre el alga preferida y el tamaño de los individuos.

Para determinar los patrones de actividad de acuerdo al periodo del día se utilizó el número de movimientos (alejamientos y acercamientos) adicionales a los tiempos de permanencia de los individuos hacia algas diferentes.

Análisis de datos

Se empleó una ANOVA anidado para probar el efecto de los tratamientos (dieta), en cada acuario, por cada individuo de cada sección es decir: 4x3x2x2.

Los datos fueron transformados a logaritmos cada vez que fue necesario.

4.3.6 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

Observaciones

Se apuntaron las fechas y sustratos de las puestas colocadas por los individuos de *E. diomedea* a lo largo de la investigación.

Además, se tomaron registros fotográficos del proceso de puesta calculando su duración.

Finalmente, se calculó el número de días transcurridos desde la ovoposición hasta la eclosión de las larvas.

Análisis de datos

Los datos de abundancia de puestas fueron transformados a porcentajes y separados por fechas.

5. RESULTADOS

5.1 SUPERVIVENCIA Y COMPORTAMIENTO DE *Elysia diomedea* EN RESPUESTA A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ

En el acuario que contenía 18 individuos bajo luz artificial, se evidenciaron niveles menores de oxígeno disuelto en relación a aquellos que contenían un menor número de individuos. Sin embargo, ambos valores de oxígeno disuelto se encontraban bajo el mismo rango normal de concentración.

El análisis comparativo de las curvas de supervivencia de Kaplan Meier desplegó que el tiempo para el que se espera que mueran al menos el 50% de los individuos, es de 34 días (mediana). El tiempo medio de supervivencia estimado estadísticamente fue de entre 35 y 36 días (media=35,848). La prueba de contraste $\log\text{-rank}^2$ desplegó un valor $p=0,618$, lo que significa que no hay diferencias significativas en la supervivencia de los dos grupos o tratamientos (Anexo 7 y Figura 13).

Los resultados del ANOVA demostraron que no existen diferencias significativas entre los individuos dentro de cada tratamiento ($p=0,659 > 0,05$), (Anexo 8).

La prueba de Mann-Whitney demostró que no existen diferencias significativas entre el efecto de los tratamientos ($p=0,345 > 0,05$), es decir, entre las frecuencias de muertes de los individuos expuestos a luz natural versus aquellos expuestos a luz artificial (Anexo 9).

Se distinguió un pico en las fechas de letalidad de los individuos, para ambos tratamientos, evidenciado en la tercera semana, con un total de muertes del 73,91%

en los individuos sometidos a luz artificial y el 50% en los individuos sometidos a luz natural (Figura14).

Las fechas de muertes registradas para los individuos de Salinas encajan dentro del periodo de letalidad general, por lo que no se observó una diferencia de supervivencia relacionada a la fecha o localidad de colección. No obstante, los individuos de Salinas sobrevivieron un mayor número de días, tomando en cuenta que fueron colectados en fechas anteriores a los de Tongorachi (Tablas 2 y 3).

5.2. SUPERVIVENCIA DE *Elysia diomedea* EN CONDICIONES DE LUZ ARTIFICIAL

No todos los sujetos murieron al final del experimento (día 53) (Tabla 4). Para entonces, el porcentaje de letalidad alcanzó un total del 77,27% (Tabla 5). Los individuos se adaptaron muy bien a las condiciones experimentales y pudieron mantenerse en buenas condiciones durante un largo periodo. Hasta el día 30 no se detectaron cambios morfológicos evidentes en los individuos, que denoten algún tipo de afectación; no obstante, durante la quinta semana se redujo aceleradamente el tamaño de los individuos (Figura 15).

Al final del experimento se obtuvieron datos censurados, sin embargo fue posible en base a la tendencia de muerte de los individuos, estimar una curva de supervivencia.

El análisis comparativo de supervivencia de Kaplan Meier demostró que el tiempo para el que se espera que mueran al menos el 50% de los individuos, es de 37 días (mediana). El tiempo medio de supervivencia estimado estadísticamente fue de 37 días (media=37,089). La prueba de contraste *log-rank*² determinó un valor

$p=0,111$, lo que significa que no hay diferencias significativas en la supervivencia de los dos grupos estudiados bajo condiciones de luz artificial en los años 2005 y 2009 (Anexo 10 y Figura 16).

Análisis comparativos entre los registros de las fechas de muerte de los individuos sometidos al tratamiento con luz artificial en el año 2005 y los resultados del presente experimento, reflejan una coincidencia entre los periodos de letalidad para ambos años (Figura 17).

En el estudio efectuado durante el año 2005 se identificaron dos fechas que registraron un mayor número de muertes, el día 18 de septiembre (58%) y el 22 de septiembre (19,22%), es decir la tercera semana de septiembre (Tabla 2). Así también, durante el experimento realizado en el año 2009 se evidenció que la mayoría de las muertes ocurrieron en dos periodos distintos, la segunda semana de septiembre (25%) y la primera semana de octubre (23,81%) (Tabla 5).

El día 22 de experimentación (14 de septiembre) se registra la primera muerte significativa durante los análisis del año 2009 (Tabla 4); mientras que, en los datos desplegados para el año 2005 se pudo evidenciar que la primera muerte significativa (41,6%) se produjo durante el día 30 de su permanencia en cautiverio (18 de septiembre) (Tabla 2).

5.3. SUPERVIVENCIA DE *Elysia diomedea* EN INANICIÓN

El registro máximo de supervivencia de *E. diomedea* en inanición fue de 53 días. Dentro de este periodo se produjeron varios eventos de muerte, sin embargo, la frecuencia de las muertes de los individuos incrementó aceleradamente a partir de la cuarta semana (Tabla 6 y Figura 18).

Los resultados del ANOVA demostraron que no existieron diferencias significativas ($p=0,536$) entre los individuos de cada pecera sometida a tratamiento (cuadro ANOVA), además la prueba Post Hoc de Tukey demostró, al agrupar los datos y comparar dos acuarios a la vez, que no existieron diferencias significativas en la frecuencia de muertes entre los individuos de ninguno de los tres acuarios (Anexo 11).

El valor promedio de supervivencia calculado para los acuarios (A, B y C con individuos en inanición fue de entre 37 y 40 días, expresado por el valor de sus medias (Anexo 12).

Durante el periodo de observación se evidenciaron múltiples cambios morfológicos, entre ellos pérdida de pigmentación, reducción del tamaño y degradación de los tejidos (Figura 19).

5.4. SUPERVIVENCIA DE *Elysia diomedea* FRENTE A DISTINTOS TIPOS DE DIETA

Los datos finales de supervivencia fueron censurados, es decir no todos los individuos alcanzaron el evento de muerte; sin embargo los resultados estadísticos develaron una tendencia de eficiencia para cada tratamiento, determinada por los valores obtenidos a partir de las curvas. La eficiencia de los tratamientos se refiere a la especie de alga junto a la cual la babosa sobrevivió mas tiempo.

Los resultados de la prueba $\log rank^2$ desplegaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (distintos tipos de dieta) (Anexo 13 y Figura 20).

Los individuos mantenidos con las algas *Padina* sp. y *Codium* sp. exhibieron menor mortalidad que las babosas alimentadas con el alga *Pterocladia* sp. El tipo de

dieta sobre la que se reportaron un menor número de muertes fue *Codium* sp. (Tabla 7 y Figura 21).

Durante el desarrollo del experimento se observó frecuentemente que los individuos permanecían largos períodos de tiempo tanto sobre el alga *Codium* sp. como sobre *Padina* sp., siendo muy raros los acercamientos observados a *Pterocladia* sp.

Tanto las babosas sometidas a tratamiento con *Padina* sp. como con *Codium* sp., fueron recuperando su color aproximadamente a inicios de la segunda semana (Figura 22).

No se registraron muertes durante el proceso previo de inanición (40 días). La supervivencia máxima registrada en el grupo de individuos muestreados fue de 61 días en condiciones de inanición (Tabla 7 y Figura 21).

5.5 PREFERENCIA ALIMENTICIA DE *Elysia diomedea*

No se registraron muertes durante el experimento ni en el periodo de inanición previo (18 días).

El alga sobre la que se registró un mayor porcentaje de tiempo de permanencia de los individuos fue *Padina* sp. (Fig. 23 y Tabla 8).

El alga *Ulva* sp. a pesar de no estar dentro de las preferidas tuvo un registro de tiempo de permanencia alto, mientras que el alga *Pterocladia* sp. presentó muy pocos acercamientos en relación a las demás especies.

Los resultados del ANOVA de los porcentajes de tiempo de permanencia de individuos medianos y grandes sobre las distintas especies de algas, desplegaron

que no existe una correlación entre la preferencia de dieta de los individuos grandes y los individuos medianos (Anexo 14).

Además el ANOVA efectuado para evaluar el tiempo de permanencia de acuerdo al tipo de algas resultó altamente significativo, es decir hay diferencias entre el tipo de dieta (Anexo 15). El gráfico de las medias muestra que hay una permanencia media mayor en el alga *Padina* sp. y que el alga *Pterocladia* sp. fue la menos frecuentada (Fig.24).

Se registró mayor actividad de los individuos durante el periodo de la mañana, especialmente al medio día (Tabla 9).

5.6 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Elysia diomedea*

Los resultados demostraron que existen dos algas preferidas por *Elysia diomedea* para colocar sus puestas: *Padina* sp. y *Codium* sp. (Fig. 25).

Los meses de mayor abundancia de puestas fueron julio, agosto y marzo (Fig. 26). El promedio observado de días que se demoran las larvas en eclosionar de sus huevos fue de 6 días.

Los individuos juveniles no fueron colectados para los fines de esta investigación; no obstante, los meses donde se divisaron ocasionalmente en el campo fueron junio, julio y en menor proporción agosto (obs. pers.) (Tabla 11).

6. DISCUSIÓN

6.1 SUPERVIVENCIA Y COMPORTAMIENTO DE *Elysia diomedea* EN RESPUESTA A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ

Los parámetros tanto de temperatura como de calidad de agua y nutrientes, fueron mantenidos bajo condiciones estándares.

Las diferencias en las concentraciones de oxígeno disuelto, evidenciadas en el acuario que contenía 18 individuos bajo luz artificial en comparación con los acuarios con menor número de individuos, no fueron significativas, pues ambas se encontraban dentro del rango normal. Este efecto pudo lograrse gracias al empleo de motores oxigenadores con una capacidad de 4 litros/minuto, que permite un alto recambio y oxigenación del agua.

En consecuencia, el objetivo de incluir a los 18 individuos en el análisis para probar el efecto de la luz sobre la supervivencia pudo ser alcanzado, pues los datos eran comparables con los de los otros acuarios.

La variable que se evaluó en este experimento fue el tipo de iluminación. Se pusieron a prueba los efectos de la luz natural (solar) versus la luz artificial (fluorescente).

Sería lógico pensar que el tipo de luz más apropiada para la supervivencia de las babosas y de cualquier organismo marino fotosintético es la natural, incluso ha sido empleada previamente en investigaciones similares (Burghardt *et al.*, 2008); sin embargo, en condiciones de laboratorio generalmente resulta complicado establecer este tipo de iluminación y estandarizarla, por estos motivos el objetivo de este experimento fue determinar si habría una influencia de la variante lumínica sobre el

desarrollo y comportamiento normal del animal, para de esta forma definir si la luz artificial puede ser empleada como una alternativa práctica en estudios de experimentación.

Para los fines experimentales resultó importante considerar que la velocidad de la luz en el aire es de 186.000 millas/segundo; mientras que en el agua, por ser un medio más denso que el aire, la velocidad de la luz desciende en un 25%, alcanzando 140.000 millas/segundo (Rosas, 2007; Kirk, 2011). Además, la luz solar esta compuesta por varios espectros, de longitudes de onda distintos, que se combinan resultando en luz blanca.

La luz visible que recibimos del Sol va desde el rojo (750nm), hasta el violeta (380nm). En el medio marino las radiaciones son absorbidas de manera distinta en la columna de agua; filtrándose a los primeros metros de profundidad los colores de onda larga que son: rojo, anaranjado y amarillo, pasando paulatinamente los de onda corta: el verde y azul. (Morel, 1974; Maffione, 2001; Badylak *et al.*, 2004).

Así, los organismos fotosintéticos que viven a diferentes profundidades están expuestos a diferentes tipos de luz y a partir de cierta profundidad, estarán mas adaptados a los azules y verdes que a los amarillos, naranjas y rojos. Este conocimiento fue la base sobre la que se seleccionó el tipo de luz artificial a emplearse.

Considerando que el sujeto de estudio *Elysia diomedea* habita las zonas intermareales (hasta 20 metros de profundidad), las demandas lumínicas pueden ser abastecidas de forma artificial por medio de focos de luz fluorescente, ya que éstos producen radiación UV a través de la ionización de gas de mercurio a baja presión y contienen además un recubrimiento fosforescente en el interior de los tubos que

absorbe la fracción de radiación UV biológicamente destructiva y la convierte en luz visible.

La luz fluorescente ha sido preferida por varios científicos para investigar comportamiento y actividad fotosintética en Sacoglossa y muchos acuariófilos sugieren que es óptima, sobretodo para acuarios de poca profundidad, porque el riesgo de fotodestrucción de los organismos por excesiva irradiación es menor en relación a otro tipo de luz, como por ejemplo la halógena; asimismo, como precursora de fotosíntesis, la luz fluorescente es más eficiente que la incandescente (Rahat y Monselise, 1979; Weaver y Clark, 1981; Vieira *et al.*, 2009).

Durante el desarrollo del experimento se anotaron datos interesantes sobre el comportamiento de *E. diomedea*. Se observó que los individuos abrían sus propodium exponiendo la parte dorsal de su cuerpo a la luz cuando existía presencia de irradiación, tanto artificial como solar.

Un estudio identificó coincidencias en la preferencia de luz en especies simbióticas y aposimbióticas de Sacoglossa, demostrando que las especies simbióticas prefieren cualquier intensidad de luz antes que la oscuridad y de manera inversa, las especies aposimbióticas, que no mantienen cloroplastos funcionales, evitan la luz (Weaver y Clark, 1981). Este dato sugiere que *Elysia diomedea* efectivamente es una especie simbiótica pues es atraída por la luz, es decir despliega un fototaxismo positivo.

Las observaciones realizadas durante el experimento demostraron una tendencia de mayor actividad de los individuos en presencia de luz, hecho que también fue reportado en estudios similares (Bertsch y Smith, 1973).

No obstante, a pesar de la atracción de las babosas a la luz, en momentos del día en los que la irradiación solar era muy intensa, las babosas de estas peceras optaban por ocultarse debajo de las algas y entre las rocas, aparentemente para reducir la incidencia directa de la luz. Así también, en ocasiones que se colocaba la luz artificial, intencionalmente muy cerca, los individuos inmediatamente cerraban sus propodium, aparentemente como una estrategia de defensa ante la fotodestrucción.

La fotodestrucción es un fenómeno que ocurre cuando la irradiación excesiva afecta la estructura de los plastos al punto de destruirlos (Hanelt, 1996; Dieter, 1996, Soule, 2007; Vieira *et al.*, 2009; Giménez-Casalduero *et al.*, 2011).

En horas del día en que la luz solar era muy baja o ausente los individuos mantenían cerrados sus propodium, de igual manera sucedía cuando se alejaba unos centímetros la fuente de luz artificial de la pecera.

Un estudio realizado en *Elysia timida* identificó patrones sobre los cuales los propodium en las babosas se abren en mayor o menor proporción, de acuerdo al tipo e intensidad de luz y horas del día. El postulado indica que los movimientos de los propodium están influenciados por un reloj biológico de la babosa y por la presencia de 3 fotoreceptores en el cuerpo: 1. Los ojos, que distinguen la iluminación óptima de la muy intensa, 2. Un fotoreceptor extraocular que distingue entre luz y oscuridad y 3. Otro fotoreceter extraocular que al igual que los ojos distingue luz óptima de muy intensa, pero únicamente la blanca (Rahat y Monselise, 1979).

Podría considerarse a la posición del propodium (abierto-cerrado) como un indicador de la percepción de luz por parte de la babosa.

Otras investigaciones identificaron la presencia de genes nucleares precursores de la fotosíntesis en una especie de la familia Elysiidae, *Elysia*

chlorotica, al parecer estos genes fueron transmitidos horizontalmente desde el alga a la babosa. La actividad de estos genes puede estar involucrada directamente con los mecanismos de regulación de luz presentes en la babosa, que a su vez están relacionados con su ritmo circadiano y en consecuencia con las reacciones fisiológicas a la luz, como abrir o cerrar los propodium (Pierce *et al.*, 2003; Rumpho *et al.*, 2008; Soule, 2009).

En base a estas formulaciones y considerando las primeras observaciones comportamentales de reacción a la luz, se logró determinar la altura óptima de la fuente de luz artificial, estableciéndose que una distancia prudencial ante la que se observaba alta actividad y propodium abiertos, fue aproximadamente 20 cm del borde superior del agua, en un acuario con un volumen de agua de 22,5 litros (45x25x20). Como resultado de estas observaciones se estableció la distancia de 20cm desde la fuente de luz hasta el acuario como parámetro fijo para los siguientes experimentos que emplearon luz artificial.

Por otro lado, en lo que respecta a la supervivencia de los individuos, los resultados estadísticos demostraron que no existen diferencias significativas ($p=0,345$) entre los días de supervivencia de las babosas bajo los distintos tratamientos (luz natural/luz artificial); por lo que se considera como una alternativa experimental óptima la utilización de focos fluorescentes para estudios de comportamiento en *Elysia diomedea*.

El experimento mostró que *Elysia diomedea* puede sobrevivir hasta **186 días** en cautiverio dotada de una fuente de alimento.

Un aspecto interesante que reflejan los datos es la coincidencia en las fechas de muerte de los individuos en cautiverio, observándose periodos evidentes de

muerte masiva, donde se alcanzó un 66,67% de mortalidad del total de individuos (Tabla 3), especialmente durante la tercera semana de septiembre que, de acuerdo a estudios climáticos estacionales efectuados por el Instituto Oceanográfico de la Armada (INOCAR) en La Libertad, que es la zona costera aledaña a Salinas, es justamente el mes donde se han evidenciado los niveles más bajos de temperatura al año (Anexo 16).

Considerando que los parámetros experimentales se encuentran controlados, el alto grado de letalidad que se produce en determinadas fechas, incluso en individuos de acuarios diferentes y bajo distintos tratamientos de luz, podría sugerir que se trate de una muerte sincronizada.

El fenómeno conocido como muerte sincronizada nunca antes se ha registrado para esta especie; sin embargo, en otras especies de Sacoglossa ha sido estudiado ampliamente. Una investigación en *Elysia chlorotica*, evidenció la expresión de un virus intrínseco que coincide con la muerte anual sincronizada de sus poblaciones, hecho que fue comprobado tanto en campo como en laboratorio (Pierce *et al.*, 1999; Mondy y Pierce, 2003).

Los resultados demostraron que el virus al parecer no es oportunista, es decir no aparece ocasionalmente, sino que se expresa una vez al año; se cree que su expresión está relacionada con la degeneración del sistema inmunológico producida durante el envejecimiento del individuo e incluso con aumentos de la temperatura del agua durante las estaciones del año (Pierce *et al.*, 1999).

Actualmente, se desconoce el ciclo de vida de *Elysia diomedea* por lo que no se puede aseverar que la muerte masiva ocurrió debido a la edad de los individuos.

Por otro lado, los resultados del cuadro de letalidad indican que los individuos de Salinas fueron los que sobrevivieron más tiempo (Tabla 2), lo que nos lleva a pensar que las condiciones de estrés del hábitat donde se desarrollan, los han conducido a obtener cierto grado de adaptación a agentes contaminantes, haciéndolas más resistentes a factores como cambios de temperatura, salinidad, condiciones del agua, etc., en relación a la población de Tongorachi.

A pesar de que la colección de los individuos de Salinas se realizó el mes de marzo, las muertes fueron registradas en el mes de septiembre, coincidiendo así con las de varios especímenes colectados en Tongorachi, en el mes de agosto.

Siendo los datos de la localidad de Salinas sumamente valiosos, no fueron contemplados dentro de los cálculos estadísticos por falta de homogeneidad con el resto de muestras. Es necesario que se desarrollen más experimentos donde las temporadas de colección se realicen en fechas similares, de manera que los datos sean totalmente comparables.

Durante el desarrollo del experimento no se realizaron análisis biológicos de calidad del agua; a pesar de tratarse de agua natural filtrada, no podemos descartar el hecho de que se haya producido una muerte masiva debido a la contaminación de los individuos con algún virus o microorganismo no detectado, presente en las algas.

Además, la coincidencia en la muerte de los individuos por sincronización, denotaría estrictamente la presencia de sucesos de estacionalidad, para lo cual se deben realizar estudios mas específicos que contemplen datos de campo como abundancia de adultos y juveniles, número de puestas, variaciones ecológicas durante invierno y verano, entre otros.

6.2 SUPERVIVENCIA DE *Elysia diomedea* EN CONDICIONES DE LUZ ARTIFICIAL

Uno de los objetivos de este ensayo, realizado en el año 2009, fue comparar los resultados de supervivencia, con aquellos observados en el 2005, experimento en el que se probó la supervivencia bajo distintas condiciones de luz y provistos de alimento. Con esta finalidad, se realizó la colecta durante la misma época del año (finales de agosto).

El tipo de iluminación aplicada fue luz blanca fluorescente. No se realizaron experimentos con tratamiento de luz natural durante este periodo de estudio, debido a que en el ensayo anterior, donde se evaluó la supervivencia bajo distintas condiciones de luz, no se detectaron diferencias significativas.

Sólo fueron estudiados individuos de la localidad de Salinas, en base a la tolerancia a variaciones ambientales que demostraron previamente y al mayor tiempo de supervivencia en cautiverio que se observó en estos individuos comparados con los de Tongorachi.

Los datos obtenidos en este experimento fueron censurados, es decir, el evento de interés (muerte) no se registró para todos los individuos, hecho que no permitió determinar con exactitud el tiempo máximo de supervivencia del total de los especímenes bajo las condiciones establecidas. No obstante, los resultados demostraron una tendencia en la frecuencia de las muertes, evidenciada en la curva de letalidad calculada (Figura 16).

El tiempo de observación para ambos experimentos fue muy similar, la diferencia radicó en que el final del experimento estuvo marcado por la muerte del

último individuo en el estudio efectuado durante el año 2005 con luz artificial; mientras que, los datos del experimento realizado en el año 2009 se vieron truncados por agentes exógenos que denotaron el final del experimento.

Pese a que el tamaño de muestra de los experimentos efectuados para los años 2005 y 2009 eran ligeramente distintos (año 2005 = 23 individuos; año 2009 = 22 individuos), con fines comparativos se emplearon los porcentajes totales de muerte para ambos casos. Cabe recalcar que, para los análisis comparativos, los datos del año 2005 estuvieron conformados únicamente por los registros de los individuos de Tongorachi, pues fueron colectados aproximadamente en la misma temporada que los de Salinas del año 2009.

Los resultados del análisis de Kaplan-Meier evidenciaron que no existen diferencias significativas en las frecuencias de muerte de los individuos ($p=0,111$), que fueron estudiados durante los años 2005 y 2009, hecho que sugiere que podría existir una relación entre la supervivencia de los individuos y las temporadas del año en las cuales se registraron sus muertes (Septiembre y Octubre). Los datos comparativos demuestran una coincidencia en las fechas de las muertes de los individuos probados en los dos años, evidenciándose que el periodo de letalidad masivo en ambos casos inició durante la segunda semana de septiembre (Figura 17).

Frente a estas evidencias se puede postular, para futuras investigaciones, la probabilidad de que exista al menos un fenómeno anual de muerte sincronizada en la especie *Elysia diomedea*, que no necesariamente está relacionado con la pérdida de capacidad fotosintética de la babosa, como ha sido reportado previamente en otro miembro del mismo género (Mondy y Pierce, 2003).

Una mejor aproximación para esclarecer la hipótesis de muerte sincronizada en *Elysia diomedea* podría alcanzarse con estudios más profundos, donde puedan determinarse factores como variaciones ecológicas y químicas en el hábitat, estacionalidad, ciclos reproductivos e incluso con monitoreos en campo que registren variaciones en la abundancia de los especímenes en determinadas épocas del año.

Por otro lado, pudieron observarse variaciones morfológicas a lo largo del tiempo durante el desarrollo de este experimento; entre éstas, a pesar de que no se tomaron medidas de longitud de los individuos, se registró una reducción de su tamaño, que fue muy notoria a partir de la cuarta semana.

Cabe mencionar que los individuos empleados como sujeto experimental en todos los estudios de esta tesis, obligatoriamente debían alcanzar una longitud no menor de 5 cm; así, para asegurar que haya existido una reducción de tamaño significativa durante el desarrollo de este experimento, se eligió un individuo al azar de entre aquellos que demostraron reducción de tamaño y se obtuvo una medida de aproximadamente 3 cm, siendo evidente que existió una reducción de la longitud en la mayoría de individuos sometidos a experimentación en relación a su tamaño original (Figura 15).

Adicionalmente, se observó que al estar dotados de una fuente de alimento, los individuos no exhibieron en ningún momento cambios de coloración relacionados con pérdida de pigmentación, ni degradación de tejido, lo que nos permite suponer que la muerte masiva registrada durante mediados de septiembre y parte de octubre no fue ocasionada por una deficiencia en el sistema fotosintético de las babosas, que generalmente ocurre cuando escasea alimento y no hay una renovación oportuna de los plastos (Teugels *et al.*, 2008).

Un evento interesante que se observó fue que se agotó más rápidamente el abasto del alga *Padina* sp. que del resto de algas que fueron extraídas del hábitat conjuntamente con las babosas (*Ulva* sp., *Codium* sp., *Sargassum* sp., *Spyridia* sp., *Pterocladia* sp.). Para la tercera semana de experimentación casi se había agotado toda la provisión de *Padina* sp. en el acuario.

Los resultados permiten suponer que *E. diomedea* estuvo alimentándose en su mayoría del alga *Padina* sp. y que es probable que a pesar de contar con un suministro de plastos, denotado por su coloración verde intenso, el requerimiento energético de las babosas no fue completamente abastecido, por lo que empezaron a consumir sus reservas corporales y en consecuencia los individuos se encogieron progresivamente.

Un estudio realizado en la especie simbiótica *Elysia crispata*, calculó el rango de crecimiento diario de individuos sometidos a distintas condiciones alimenticias. Los resultados indicaron que la pérdida de peso de los individuos era más acelerada y pronunciada en aquellos que fueron privados de una fuente de alimento, en relación a aquellos que fueron provistos de algas. No obstante, también se registraron variables en el peso de los individuos sometidos a distintas dietas, evidenciándose inclusive gran pérdida de peso en individuos alimentados con algas aparentemente inadecuadas para su desarrollo (Thompson y Jarman, 1989).

Otra hipótesis que podría explicar la reducción de tamaño de los individuos, incluso dotados de una fuente de alimento, es el envejecimiento. El envejecimiento está relacionado con degeneración celular en la mayoría de los casos. Una investigación realizada durante casi 10 años identificó la posible relación existente entre la activación de un virus intrínseco y el inicio de un proceso de apoptosis

sincronizado en los individuos adultos de poblaciones de *Elysia clorotica* en Estados Unidos (Mondy y Pierce, 2003).

Los eventos de apoptosis involucran una serie de cambios fisiológicos que desencadenan inestabilidad celular, conduciendo a degeneración celular, misma que puede verse reflejada por una reducción del tamaño celular y en consecuencia del tamaño corporal de los individuos, en el caso de invertebrados (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Curtin y Cotter, 2003). Sin embargo, la investigación realizada por Mondy y Pierce (2003), no fue capaz de determinar una reducción del tamaño de los sujetos experimentales dotados de alimento al acercarse su fecha de muerte, por lo que no se cuenta con evidencia confiable para apoyar este postulado. Es necesario que se profundice más en futuras investigaciones, mediante análisis más específicos, que permitan identificar estos posibles fenómenos fisiológicos en *Elysia diomedea*.

6.3 SUPERVIVENCIA DE *Elysia diomedea* EN INANICIÓN

El experimentó demostró que la especie *Elysia diomedea* pudo sobrevivir hasta **53 días** en ausencia de una fuente de alimento (Tabla 6).

Este alto nivel de supervivencia en privación de alimento sugiere que las babosas podrían haber empleado, durante ese periodo de tiempo, una fuente alternativa de energía probablemente adquirida por el fenómeno conocido como endosimbiosis o cleptoplastia.

La cleptoplastia es común en algunas familias de Sacoglossa (Conchoidea, Stiligerioidea y Elisioidea); sin embargo, la longevidad de ésta depende de la especie y de su tipo de dieta (Mujer *et. al.*, 1996).

En los sacoglossos se distinguen tres tipos de habilidades fotosintéticas, a) la retención afuncional, donde las babosas retienen plastos que no son activos en ninguna fase de su vida; b) retención de corto plazo, que se refiere a etapas funcionales de hasta 10 días; c) retenciones de largo plazo, aquellas que persisten por periodos desde semanas a meses (Händeler *et al.*, 2009).

Para poder aseverar que *E. diomedea* forma parte del grupo de las especies simbiontes, sería necesario emplear estudios de microscopía y técnicas moleculares o bioquímicas que evidencien tanto la presencia de los plastos en los individuos estudiados, como los cambios fisiológicos y funcionales de sus organelas secuestradas.

Se han realizado previamente investigaciones en esta especie que han reportado tiempos máximos de supervivencia en inanición, complementados con análisis de funcionalidad de plastos, demostrando la relación directa que existe entre ambos factores (Trench *et al.*, 1969).

Con estos antecedentes, podemos sugerir que si bien el tipo de ensayos realizados no permitió comprobar la funcionalidad de los plastos y por consiguiente la actividad fotosintética de los individuos estudiados, en el transcurso del experimento se evidenciaron cambios morfológicos importantes que pueden denotar variaciones fisiológicas relacionadas con la presencia de plastos y que, en base al tiempo máximo de supervivencia de 53 días, son congruentes con lo postulado en el estudio inicial sobre la endosimbiosis a largo plazo (6 semanas) que ocurre en *E. diomedea* en estado de inanición (Trench *et al.*, 1969).

Cabe mencionar que para asegurar la ausencia de cualquier tipo de organismo que pudiera servir de fuente de alimento e interfiriera en el experimento,

se empleó agua natural filtrada, la cual fue cambiada cada vez que las pruebas demostraban tendencias nocivas sobre su calidad.

Dentro de los cambios morfológicos que pudieron registrarse se observaron, a partir del décimo día, una **pérdida de fluorescencia de los puntos azul-turquesa** presentes en la parte dorsal (Figura 27). Cerca del día 25 de supervivencia en inanición, se observó una notoria **pérdida de pigmentación** de los individuos, cambiando de verde oscuro a verde pálido casi amarillento (Figura 28).

Posteriormente, casi inmediatamente después de perder su pigmentación, inició una **reducción acelerada del tamaño de los individuos**, misma que se hizo evidente aproximadamente a la quinta y sexta semana de inanición (Figura 19). Finalmente, a medida que el tiempo pasaba, generalmente una semana antes de su muerte, comenzó a manifestarse una **degeneración de la textura de los tejidos**, haciéndose muy delgados y débiles.

Los peculiares **puntos turquesa** han sido observados también en otras especies de *Sacoglossa* y se ha descubierto que son pigmentos iridiscentes contenidos en células independientes, llamadas cromatóforos, localizados debajo de la epidermis, en el hemocoele de las babosas. Esto significa que las células, junto con sus pigmentos, pueden transportarse libremente a través de la hemolinfa (Curtis, 2006; Rudman, 2009). A pesar de que se han hecho observaciones microscópicas de estas estructuras, su composición y función actualmente son desconocidas, por este motivo, resulta difícil deducir la causa de la reducción de este pigmento en las babosas. Sin embargo, se presume que la presencia de estos pigmentos iridiscentes, depende o guarda relación con la longevidad y capacidad que tiene la babosa para

retener sus plastos funcionales, así como también con el tipo de alga que conforma su dieta y el tiempo que lleve sin alimentarse (Rudman, 2009).

Por otro lado, de acuerdo a estudios previos sobre la morfología externa de *E. diomedea*, se conoce actualmente que la coloración verdosa de la mayoría de elísidos se debe a microscópicos puntos que se encuentran debajo de la superficie externa del cuerpo y conforman los puntos ciegos del divertículo digestivo donde se albergan los plastos secuestrados (Mc Farland, 1924; Gosliner, 1995; Curtis, 2006; Figura 29).

En base a lo expuesto, se postula que el **cambio de coloración** de los individuos podría estar provocado por una reducción de la concentración de clorofila en los tejidos, que involucraría una degradación de los cloroplastos (Teugels *et al.*, 2008). Este fenómeno ha sido estudiado y comprobado en otras especies del género, como por ejemplo en la especie *Elysia timida*; los experimentos demostraron una reducción del 65% de la concentración de clorofila durante los primeros 9 días de inanición en condiciones de luz artificial (Giménez-Casalduero y Muniain, 2006).

Las investigaciones realizadas sobre el tiempo de retención y funcionalidad de plastos en varias especies de Sacoglossa han determinado que a pesar de que los cloroplastos se mantienen funcionales por periodos de tiempo de varias semanas o incluso meses, existe una pérdida significativa de pigmento que se hace evidente a partir de la primera semana (Hawes y Cobb, 1980; Mujer *et al.*, 1996; Giménez y Muniain, 2006).

Múltiples estudios se han realizado sobre la funcionalidad y la variación estructural de los plastos en especies de sacoglosos simbioses. Las evidencias demuestran que los plastos no son independientes, sino que su funcionalidad y la

estabilidad de su estructura dependen en gran medida de proteínas sintetizadas desde el núcleo.

El proceso de fotosíntesis requiere de la interacción de casi 1000 proteínas, de las cuales únicamente el 13% son codificadas en el genoma del plasto (Hanten y Pierce, 2001). Este hecho condujo al desarrollo de estudios moleculares más profundos en los cuales se identificó la presencia de genes nucleares que codifican para algunos productos precursores de la fotosíntesis, por lo que se cree que estos debieron ser transferidos al genoma nuclear de la babosa durante estadios iniciales de evolución simbiótica, proporcionando de esta forma todos los polipéptidos nucleares esenciales necesarios para la funcionalidad de la organela simbiote (Pierce *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2003).

Las larvas de babosas no poseen pigmentos hasta el estado post velígero, lo que sugiere que los cloroplastos son adquiridos *de novo* de su dieta en cada generación (Trench *et al.*, 1969). Una vez que la babosa se alimenta, los plastos son fagocíticamente incorporados dentro del citoplasma de uno de los dos tipos morfológicamente distintos de células epiteliales y mantienen su función fotosintética (Mujer *et al.*, 1996).

Durante su función simbiote, los plastos no poseen la capacidad de dividirse por lo que su provisión debe ser renovada periódicamente (Hawes y Cobb, 1980). Si bien los individuos experimentales fueron colectados en la misma fecha, no es posible conocer la antigüedad que poseían los plastos que probablemente estaban presentes en las babosas; éste puede ser uno de los motivos por los que existen diferencias leves entre el número de días de supervivencia de los individuos, mismas que demostraron no ser estadísticamente significativas.

Otra hipótesis que podría explicar la pérdida de pigmentación y posible funcionalidad de plastos es la aposimbiosis temporal. Este fenómeno aparentemente sucede en especies que cambian su dieta dependiendo de la estación. Un estudio realizado en una especie cercana (*Elysia furvacauda*) identificó que existe un período del año en el que los plastos dejan de ser funcionales, siendo esta aposimbiosis temporal un mecanismo empleado por la babosa para adaptarse a su nueva dieta (Brandley, 1984).

Es probable que *Elysia diomedea* se alimente de distintas algas, dependiendo de la temporada del año, como ya se ha visto en otras especies que pueden incluir en su dieta natural varias especies de algas, sin limitarse a una sola (Brandley, 1984). Esto determinaría posibles cambios estacionales de niveles de fotosíntesis dependiendo de su dieta.

Adicionalmente, la **reducción de tamaño** observada durante el desarrollo del experimento, demuestra una desnutrición progresiva de los individuos que puede ser dependiente de la capacidad fotosintética y de sus productos, hecho que fue evidenciado en un estudio realizado en la especie *Elysia viridis*. Dicho estudio demostró la importante fuente energética que representa la fotosíntesis para la supervivencia y nutrición de las babosas simbiontes, en privación de alimento, al comparar individuos mantenidos en condiciones de inanición en la oscuridad frente a otros expuestos a una fuente de luz óptima. Debido a que los procesos fotosintéticos son más eficientes en condiciones de luz, los resultados estuvieron acorde con lo esperado, manifestando una reducción de tamaño 20% mayor en individuos mantenidos en la oscuridad frente a aquellos expuestos a condiciones de luz (Casalduero y Munian, 2008).

En base a los resultados, se sugiere que para conocer la verdadera longevidad funcional de los plastos en *E. diomedea* es necesario realizar análisis tanto estructurales como estacionales, de manera que se pueda establecer si existe alguna diferencia entre la actividad de los plastos de acuerdo a la temporada del año. Adicionalmente, podemos deducir que un estudio de preferencia alimenticia y la identificación de la dieta natural de *Elysia diomedea* permitiría relacionar el tipo de plastos adquiridos con el tiempo máximo de supervivencia en inanición observado durante esta investigación (61 días).

6.4 SUPERVIVENCIA DE *Elysia diomedea* FRENTE A DISTINTOS TIPOS DE DIETA

Nunca antes se han realizado experimentos probando distintas especies de algas para medir la supervivencia y evaluar el comportamiento de *Elysia diomedea*, ante distintos tipos de dieta. Sin embargo, se conoce que los plastos tienen un tiempo de vida y deben ser restituidos para reactivar las funciones fotosintéticas de los organismos, se sabe también que el tiempo máximo de funcionalidad de plastos registrado para esta especie fue de 6 semanas (Trench *et al.*, 1969) y finalmente, gracias a los resultados de esta investigación, se ha evidenciado que *E. diomedea* puede sobrevivir hasta 53 días en privación de una fuente de alimento, periodo en el cual a los 25 días de observación, se empiezan a manifestar cambios de pigmentación que sugieren una pérdida de funcionalidad de sus plastos.

Con estos antecedentes, previo al desarrollo del experimento, las babosas fueron mantenidas en inanición durante 40 días. En base a la bibliografía y a los resultados del experimento de supervivencia en inanición realizados en el presente

estudio, se consideró que un periodo de privación de alimento de 40 días era suficiente como para que el experimento de supervivencia bajo distintos tipos de dieta, no se viera influenciado por la activación de los plastos secuestrados previo a la colección de cada individuo.

En base a la literatura se conoce que el nivel de simbiosis que manifiesta cada especie de *Sacoglossa*, definirá el tiempo que estas deban mantenerse en inanición previo a la realización de experimentos de preferencia alimenticia, de eficiencia fotosintética o de supervivencia probando distintos tipos de dieta. Así, se ha visto en investigaciones anteriores, que los tiempos de inanición pre-experimentales pueden abarcar desde un par de horas hasta varios días, dependiendo de la especie (Gianguzza *et al.*, 2002; Burghart *et al.*, 2008; Klochkova *et al.*, 2010).

Durante el periodo de inanición no se registraron muertes; sin embargo, se pudieron observar síntomas de degeneración de plastos, como por ejemplo pérdida de pigmentación (Figura 28).

Con la excepción de tres especies, todos los *Sacoglossa* son herbívoros que se alimentan del citoplasma de algas marinas (Jensen, 1997).

Actualmente, se desconoce la dieta natural de *Elysia diomedea*; sin embargo, tanto en su hábitat como en cautiverio se las ha observado en repetidas ocasiones alimentándose de algas pertenecientes al género *Padina*, por lo que se ha sugerido que podrían alimentarse de especies de este grupo (Bertsch y Smith, 1973; Jensen, 1980; Trowbridge, 2001; Händeler y Wägele, 2007).

Además, investigaciones realizadas en individuos de la familia Elysiidae han demostrado que estos pueden manifestar una variación en su dieta, generalmente dentro de especies del mismo orden, las Bryopsidales (=Caulerpa=Codium

=Siphonales) e incluso algunas veces pueden cambiar a Dasycladales (Cimino y Ghiselin, 1998). Se ha visto además que algunas especies de Sacoglossa pueden alimentarse de varias algas, no sólo de las Chlorophyceae sino también de Rhodophyceae (Pierce *et al.*, 1999).

Las tres especies de algas que se probaron en este experimento fueron seleccionadas tanto por datos bibliográficos como por ser parte de la composición del hábitat donde las babosas eran encontradas con frecuencia en campo. El experimento pretendió probar la reacción y tolerancia de *Elysia diomedea* expuesta a distintos tipos de dieta, de grupos de algas de linajes distintos, es decir Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta.

Considerando que el tipo de plasto que adquieran las especies de babosas dependerá enteramente de la dieta, se esperaría que las diferencias en los plastos presentes en las especies de Sacoglossa determinen su actividad fotosintética y permanencia en el huésped (Händeler *et al.*, 2010; Klochkova *et al.*, 2010).

Varias investigaciones han demostrado las diferencias significativas que existen entre la longevidad endosimbiótica de los plastos de las clorofitas y de las cromofitas, en otras especies de *Elysia*. La evidencia demostró que hay dos factores principales que controlan estas diferencias, la autonomía de los genes cloroplásticos y la estabilidad de sus proteínas (Hawes y Cobb, 1980; Rumpho *etal.*, 2000).

El presente estudio demostró una mejor adaptación de *Elysia diomedea* a las algas *Padina* sp. y *Codium* sp. pues gran parte de los individuos lograron recuperarse, sobrevivir más tiempo y en mejores condiciones que los individuos control que permanecían en inanición (Figura21). Hechos que indican una respuesta

positiva al tratamiento e incluso podría demostrar que las babosas estuvieron alimentándose de estas especies de algas.

A pesar de que se ha observado que en ausencia de su huésped, algunos *Sacoglossa* pueden variar su dieta natural y ajustarse a una nueva especie de alga, sobreviviendo eficazmente, en ocasiones la especie no cuenta con reserva energética suficiente como para sobrevivir en un alga que no es parte de su dieta natural, hecho que puede terminar en la muerte del animal. La calidad y cantidad de reservas alimenticias de las babosas, obtenidas por diferentes algas, pueden variar dependiendo del tipo de alga e influenciar sobre su supervivencia, en especial mientras aprende a alimentarse de un alga no familiar (Trowbridge, 1991; Trowbridge y Todd, 2001; Klochkova *et al.*, 2010).

Las babosas alimentadas con el alga *Pterocladia* sp. sobrevivieron menos tiempo que las babosas sometidas a las otras dietas, lo que podría indicar que ésta no es óptima para criar *Elysia diomedea* en cautiverio, pues los individuos no reaccionaron positivamente al tratamiento, esto se refleja por la cantidad de muertes masivas prematuras registradas, en comparación con las otras especies de algas. Este resultado sugiere que probablemente el costo energético para adaptarse a este nuevo tipo de alga fue demasiado alto.

Existen evidencias de que la pérdida de color de las babosas, causada por inanición, puede ser restituida una vez que los individuos son expuestos a una fuente alimenticia óptima. Un estudio demostró como la especie fotosintética *Elysia clarki* que había sido mantenida en privación de alimento adquirió una coloración amarillenta, sin embargo, 30 días después de ser alimentada constantemente con el alga *Penicillus capitatus* recuperó su coloración verdosa, comprobando así que la

babosa incorporó nuevamente cloroplastos dentro de su divertículo digestivo (Curtis, 2006).

Por otro lado, la única especie de alga sobre la que se registraron puestas de huevos durante el período de observación fue *Codium* sp. (Figura 30 B), lo cual podría denotar cierta preferencia por esta especie de alga. La cantidad de puestas registradas sobre las distintas especies de algas podría servir como indicador de selección de dieta en base a la ventaja ecológica o adaptativa que esta le puede brindar.

Estudios comparativos en larvas y adultos de la especie congénera *Elysia clarki*, demostraron que las larvas recién eclosionadas se alimentan de algas diferentes a las que consumen los adultos (Curtis *et al.*, 2007). Este fenómeno podría estar ocurriendo también en *Elysia diomedea*, lo que explicaría que las babosas colocaran sus huevos únicamente sobre el alga *Codium* sp., a pesar de responder positivamente también al tratamiento con *Padina* sp.

Se ha determinado que un tipo diferente de dieta puede conducir a una variación en los colores de las babosas, así como de sus puestas, lo cual puede darnos pistas acerca del alga de la que está alimentándose (Trowbridge y Todd, 2001). No obstante, en el presente experimento no se registraron cambios evidentes en la coloración, tanto de los individuos como de sus puestas, que denoten algún tipo de preferencia alimenticia.

Por otro lado, el experimento permitió registrar un dato interesante sobre supervivencia en inanición, ya que los individuos empleados como control que permanecieron aislados de una fuente de alimentación, lograron sobrevivir hasta

61 días. Este dato supera al registro obtenido en el experimento anterior, donde se reportó un tiempo máximo de supervivencia de **53 días.**

Si bien los resultados obtenidos no permiten determinar con exactitud la dieta natural de *Elysia diomedea*, sugieren que estas babosas pueden alimentarse de especies de algas de grupos filogenéticos distintos e incluso secuestrar sus plastos, recuperando su pigmentación y probablemente su actividad fotosintética.

Este estudio demuestra una adaptación alimenticia de *Elysia diomedea* a las especies de algas *Codium* sp. y *Padina* sp.; no obstante, para aseverar que alguna o ambas especies forman parte de la dieta natural y son la fuente de los plastos simbioses de *E. diomedea* se requieren estudios moleculares, bioquímicos o de microscopía que sustenten este postulado.

Por lo pronto, esta investigación sirve de aporte científico al determinar que *E. diomedea* reacciona favorablemente a tratamientos de alimentación en cautiverio tanto con la especie *Codium* sp. como *Padina* sp. y por lo tanto, son sujetos de experimentación interesantes para descubrir los procesos adaptativos de estas babosas y su dieta.

6.5 PREFERENCIA ALIMENTICIA DE *Elysia diomedea*

El experimento fue realizado para comprobar la preferencia de sustrato de *Elysia diomedea* en base a pequeños muestreos en los cuales se registró el tiempo de permanencia de los individuos sobre un alga seleccionada, entre un grupo de cuatro especies distintas. La preferencia de sustrato brindará además un indicio de cuál podría ser la dieta natural o preferida por los adultos de *E. diomedea* en cautiverio.

Durante el desarrollo del experimento se aplicaron criterios empleados en estudios similares, en los cuales se demostró exitosamente que el número de individuos que se acercuen o se registren sobre un alga determinada, constituye un índice de preferencia (Trowbridge, 1991; Middlebrooks, 2011).

Se evidenció que las horas de mayor actividad de *E. diomedea* fueron durante los momentos de mayor irradiación solar, es decir en la mañana, medio día y en horas tempranas de la tarde (Tabla 9).

Estos resultados pueden estar relacionados al aprovechamiento máximo de la disponibilidad de luz, ya sea para encontrar su alimento o para ejecutar sus funciones fotosintéticas, como ya ha sido demostrado en estudios de fototaxia y ritmos circadianos en otros miembros de los sacoglosos (Weaver y Clark, 1981; Schmitt y Wägele, 2011).

Los resultados de este experimento, combinados con aquellos obtenidos a partir del cálculo de supervivencia frente a distintos tipos de algas, demostraron un componente trófico implicado en la selección del alga, pues las dos especies registradas como preferidas, *Padina* sp. y *Codium* sp. (Tabla 8), son a su vez las que mejor funcionaron en el experimento de supervivencia descrito anteriormente en este documento.

El alga que se encontró en mayor abundancia en el hábitat de *E. diomedea* fue *Ulva* sp. Sin embargo, la diferencia en la proporción de su presencia en el hábitat versus las otras especies probadas, no constituye un factor relevante que sugiera la preferencia alimenticia de *Elysia diomedea*. Se ha comprobado en algunos estudios de relaciones de dieta-predador en invertebrados, que no siempre el alga más común en el hábitat natural es la que forma parte de la dieta preferida, incluso en ocasiones

se ha visto que el alga más importante en la alimentación de las babosas es la que se encuentra con menos frecuencia o en menor proporción (Carefoot, 1980). Al respecto es importante considerar también el hecho de que en ambiente natural, las olas del mar juegan un rol muy importante en la identificación de las algas sobre las que son observadas las babosas en campo, ya que la fuerza de éstas en muchas ocasiones desplaza a los individuos hacia diferentes sustratos.

A pesar de que en el campo las babosas han sido observadas en varias ocasiones sobre la especie *Ulva* sp., incluso en localidades distintas a Salinas, los registros de permanencia de los individuos sobre esta alga fueron bajos en comparación con las especies predominantes *Padina* sp. y *Codium* sp. (Figura 22), lo que indica que si bien *Ulva* sp. es una especie que evidentemente alberga invertebrados como *E. diomedea*, no es la preferida en cautiverio cuando es ofrecida como alternativa alimenticia junto con *Codium* sp. y *Padina* sp.

Generalmente los Sacoglossa despliegan una homocromía nutricional que está relacionada al tipo de plastos que ingieren (Jensen, 1997) los cuales además le conceden a la babosa la oportunidad de poder camuflarse o mimetizarse en su medio (Marin y Ros, 2004). Bajo este criterio es correcto suponer que *E. diomedea* se alimenta de un alga verde (Chlorophyceae). Estudios experimentales de preferencia alimenticia en los cuales se analizan también genes y pigmentos de los plastos secuestrados, han determinado que una de las especies preferidas comúnmente por los Sacoglossa es *Codium fragile* (Jensen, 1989; Handeler *et al.*, 2010).

Observaciones realizadas de *E. diomedea* en cautiverio en el año 1973, determinaron que estos individuos pueden alimentarse del alga *Padina* sp. e incluso

es una de las especies preferidas al ser colocada junto con algas de otro género (Bertsch y Smith, 1973), tal como se evidenció en el presente estudio.

Por otro lado, se registraron muy pocos acercamientos y periodos de permanencia sobre el alga roja *Pterocladia* sp., este dato es congruente con el experimento de supervivencia frente a distintos tipos de dieta, en el cual se evidenció un mayor índice de mortalidad en los individuos alimentados con esta especie.

Durante años se ha tratado de esclarecer el misterio de la preferencia alimenticia de los Sacoglossa sobre una o varias especies de algas, la mayoría de estudios sobre el tema coinciden en que uno de los factores más importantes que gobierna la selección de una dieta determinada, es su valor nutricional (Carefoot, 1980).

Estudios nutricionales en las especies *Ulva lactuta* y *Pterocladia capillacea* demostraron que esta última posee un valor relativamente mayor de proteínas, cenizas y fibra, pero menor de carbohidratos y calorías en comparación con *Ulva* sp. Además, ambas especies poseen casi la misma cantidad de contenido de lípidos y aminoácidos (Wassef, 2005; Waseff *et al.*, 2005).

Otra investigación encontró que la especie *Ulva lactuta* posee un mayor porcentaje de proteínas y calorías que la especie *Codium fragile*. Mientras que, esta última presente mayor cantidad de lípidos y cenizas (Ortiz, 2011).

Por otro lado, un estudio comparativo de las algas marinas de Baja California en México, determinó diferencias en los valores nutricionales de las algas *Ulva spp.* y *Padina durvillaei*, dentro de las cuales destaca la significativamente mayor proporción de Mg y Zn presente en *Ulva spp.*, mientras que, el alga *P. durvillaei* contiene un

mayor valor nutricional de Fe y K, siendo muy parecidos los valores de Ca, P, Na y Cu presentes en ambas especies (Carrillo, 2002).

Además, un importante hallazgo en cuanto al potencial nutricional del alga *Padina pavonica* determinó que estas algas presentaban propiedades que permitían mejorar la fijación del calcio en los tejidos biológicos, particularmente en mamíferos, moluscos y artrópodos (Gutiérrez, 2004).

De acuerdo a la literatura, todas las especies de algas probadas poseen un valor nutricional importante y similar en muchos aspectos, por lo que resulta difícil afirmar en esta investigación que un alga fue seleccionada como alimento debido a su valor nutricional.

Otro postulado dice que dadas las características alimenticias suctorias, el reconocimiento del alimento y su selección, en las especies de Sacoglossa, están controlados por la combinación de varios factores, de los cuales la estructura y tipo de plastos de la planta aparentemente son los más importantes (Gianguzza *et al.*, 2002).

Se ha visto que solo cierto tipo de plastos son retenidos como simbioses y generalmente los plastos de algas Siphonales, como *Codium* sp., son más resistentes a tratamientos que destruyen otros plastos (Clark *et al.*, 1981; Grant y Borowitzca, 1984). Este criterio podría explicar la preferencia de *E. diomedea* por la especie *Codium* sp. y las evidencias microscópicas de su forrajeo (Figura 31A).

El tipo de forrajeo que se observa en Sacoglossa es peculiar y eso permite identificar si un alga ha sido consumida o no. Por lo general, las babosas extraen de la corteza del alga su protoplasma rico en plastos, con la ayuda de la rádula, que es una estructura especializada similar a un estilete, a manera de diente (Clark, 1992).

Un estudio donde se probó la alimentación de *Placida dendritica* (Sacoglossa) sobre la especie *Codium* sp., empleada también en el presente experimento, identificó el consumo del alga a partir de variaciones morfológicas, que incluían cambios en la coloración y textura del tejido del alga, pasando de una apariencia inicial color verde oscuro y consistencia firme, a un verde pálido con textura blanda (Trowbridge, 1992).

Si bien en este estudio no se han empleado técnicas o análisis que detecten la especie de alga contenida en el organismo de las babosas, existen varios indicadores cualitativos que sugieren que *E. diomedea* estuvo alimentándose de la mayoría de las especies de algas que fueron parte del experimento.

Dentro de los indicadores mencionados podemos citar:

1. *Antecedentes*, estudios similares de registros de acercamiento y permanencia para análisis de preferencia alimenticia, indicaron la coincidencia entre las especies más frecuentadas y las especies establecidas como parte de la dieta en base a la identificación de plastos y restos fecales (Trowbridge, 1991; Gianguzza *et al.*, 2002).

2. *Cambios morfológicos*, se ha comprobado que cuando los individuos se mantienen sin alimentarse, se evidencian una serie de cambios manifestados principalmente por una pérdida de pigmentación; en el caso de los individuos estudiados, no se detectaron variaciones en la coloración durante el periodo de prueba.

3. *Movimiento alimenticio*, previamente se ha descrito a detalle el movimiento realizado por los Sacoglossa para alimentarse, los cuales incluyen raspar, perforar y succionar el contenido del alga (Jensen, 1981; Jensen, 1989). Los individuos

estudiados registraron en varias ocasiones movimientos similares a los descritos, sobre las algas probadas, a excepción del alga roja *Pterocladia* sp.

4. *Análisis de microscopía*, al comparar las algas frescas, recién colectadas, con las sometidas a experimentación, se observaron signos de forrajeo en las tres especies, *Ulva* sp., *Padina* sp. y *Codium* sp. (Figura 31).

Los resultados indican que *E. diomedea* no es una especie que prefiere un alga específica, es decir que no tiene una dieta especializada, sino que puede seleccionar al mismo tiempo especies que difieren ampliamente en sus características y los tipos de plastos que la componen, alimentándose incluso de grupos filogenéticos distintos; esta observación es congruente con lo postulado en otros estudios anteriores que mencionan la relativamente baja especificidad de dieta que presenta la familia Elysiidae dentro del grupo de los opistobranquios (Jensen, 1980; Thompson y Jarman, 1989).

La plasticidad o capacidad de variar la selección de una dieta determinada ya ha sido reportada en algunos miembros de los Sacoglossa. Una investigación reciente, realizada en seis especies de este grupo y 37 especies de algas, determinó que si bien las babosas pudieron alimentarse de distintos tipos de algas después de haber sido sometidas a periodos largos de inanición, al ofrecerles varias opciones de dieta se evidenciaron dos sucesos; a) los individuos se alimentaban de una especie de alga a la vez, es decir, no se encontró más de un tipo de plasto en los análisis celulares, b) en todas las ocasiones las babosas preferían una especie de alga determinada (Klochkova *et al.*, 2010).

Estudios complementarios sobre el tema mencionan que la variación en la preferencia de más de una dieta en algunas especies está ligada a la oportunidad de explorar nuevas especies de algas (Cimino y Ghiselin, 1998; Marín y Ros, 2004).

Como ya se mencionó anteriormente, se ha sugerido que el alga parda *Padina* sp. podría ser parte de la dieta de *E. diomedea*, el motivo de la alimentación peculiar de esta babosa en una especie de alga parda podría estar relacionado con la ventaja ecológica que le proporcionen los compuestos químicos adquiridos.

Dentro del grupo de los elísidos existen varias especies que, al carecer de una concha protectora, secretan sustancias químicas tomadas de las algas de las que se alimentan y utilizadas como defensa frente a sus predadores. En el caso de *Elysia diomedea* se ha identificado que esta especie no sólo extrae las sustancias químicas de su dieta sino que también sintetiza nuevas sustancias repelentes, conocidas como elysiapironas, las cuales representan una ventaja adaptativa adicional de esta especie, pues se ha comprobado que le brindan una protección a los plastos simbioses para aliviar los posibles daños inducidos por la luz. (Cueto *et al.*, 2005; Díaz-Marrero *et al.*, 2008). Se cree que esta ventaja adaptativa fue desarrollada por *E. diomedea* como una respuesta a las presiones lumínicas de su ambiente, pues se conoce que esta especie habita en zonas intermareales donde, si bien la luz es atenuada con el efecto del agua, hay una penetrancia significativa de los rayos ultravioletas tanto en periodos de marea baja como de pleamar (Ireland y Scheur, 1979).

Se ha evidenciado la presencia de metabolitos secundarios no-polares en *Padina* sp. que aparentemente le sirven para ahuyentar a sus predadores. Un estudio empleó varias especies de algas para probar su susceptibilidad ante distintos

herbívoros predadores, los resultados indicaron que *Padina* sp. fue una de las dos especies que los animales evitaban ingerir, al analizar la composición de esta alga se determinó que esta especie posee una defensa química y que su éxito depende del tipo de predador, siendo más susceptibles a unos herbívoros que a otros (Steinberg y Paul, 1990).

Otra de las especies que fue aparentemente consumida por *E. diomedea*, aunque en mucha menor proporción considerando el tiempo de permanencia, fue *Ulva* sp. Esta especie es muy común en el hábitat de la mayoría de *Sacoglossa* y existe la posibilidad de que haya sido considerada como una especie adicional a su dieta, pues representa una fuente rica en nutrientes y en cloroplastos. El planteamiento de esta hipótesis no está muy alejado de la evidencia circunstancial, pues existen reportes previos de especies de *Sacoglossa* simbiontes que se alimentan del alga *Ulva* sp. (Jensen, 1993b; Händeler y Wägele, 2007).

El presente estudio permite conocer más acerca de la composición y preferencia de dieta de las babosas en cautiverio; no obstante, para determinar la dieta natural se deben realizar investigaciones exhaustivas que contemplen varios factores no evaluados en condiciones experimentales, por ejemplo la estacionalidad. En la costa de nuestro país existen temporadas del año en las que se registra mayor abundancia de un alga u otra, además se ha establecido que existen grandes diferencias en la composición química de las algas, la cual está estrechamente relacionada con las estaciones, hecho que podría determinar que un organismo no especialista cambie su preferencia de alimento, priorizando el alga que le brinde mayor valor nutricional en ese momento del año (Carefoot, 1980).

Finalmente, en términos prácticos, es muy importante develar la dieta natural u óptima de las especies de *Sacoglossa* simbióticas, como es el caso de *E. diomedea*, en primer lugar como aporte al esclarecimiento de una variedad de procesos evolutivos implicados y en segundo lugar por el potencial biomédico que se ha comprobado que tienen las sustancias químicas que producen estos individuos (Koreeda y Akagi, 1980; Ireland y Faulkner, 1981; Cimino y Ghiselin, 1998; Davies-Coleman y Garson, 1998; Nuijen *et al.*, 2001; Cueto *et al.*, 2005).

6.6 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Elysia diomedea*

Durante el presente estudio se tomaron registros de los huevos colocados en cautiverio. Se describieron las características de las puestas, su ubicación y la fecha en la que fueron colocadas.

Los experimentos que se desarrollaron a lo largo de esta investigación no fueron diseñados ni se enfocaron en analizar los factores necesarios para propiciar la eclosión de las larvas y posteriormente su metamorfosis. Hasta la actualidad no se han publicado trabajos que describan los requisitos para criar *Elysia diomedea* en cautiverio, pero se presume, por resultados observados en especies de la misma familia, que generalmente las larvas eclosionan 6–8 días después de que ha sido colocada la puesta (Trowbridge, 2002). Además, se ha observado que las larvas en la mayoría de *Sacoglossa* son de tipo velígero y que se alimentan de plancton (Trowbridge, 2002).

Las puestas en *Sacoglossa* comúnmente se distinguen por ser masas gelatinosas espirales; estas características han sido descritas previamente para la especie *E. diomedea* y fueron constatadas a su vez en esta investigación (Bertsch y

Smith, 1973). El tamaño de las puestas observadas regularmente era de un diámetro de 1-3 cm (Figura 2).

De acuerdo a lo observado, el proceso de puesta tiene una duración de entre 3 y 4 horas, durante este tiempo los huevos salen del gonoporo, ubicado en la parte derecha de la cabeza, a manera de delgados hilos blanquecinos y son colocados sobre la superficie mediante lentos movimientos circulares (Figura 32).

En el caso de *Elysia diomedea* los registros determinaron que las larvas eclosionan generalmente a los 6 días de colocados los huevos. Sin embargo, también se observaron eclosiones al 4to y 5to día pero en mucha menor proporción (Tabla 10). Las larvas pudieron observarse como pequeños organismos nadadores libres blanquecinos, no obstante, no se realizaron observaciones mas detalladas sobre la anatomía y estructura de las mismas.

No se presenció ningún evento de metamorfosis de las larvas durante la investigación, esto puede deberse a que los experimentos fueron efectuados con agua de mar natural filtrada, por lo que es muy improbable que existiese fitoplancton presente y por lo tanto, no se pudieron abastecer las necesidades básicas para que las larvas se desarrollen y alcancen un estado competente para su metamorfosis.

Se ha reportado en otros miembros de la familia Elysiidae que existe una muerte masiva de los individuos adultos poco tiempo después del periodo de puestas, en ocasiones dependiente de la estación del año; inclusive algunas investigaciones proponen que esta muerte puede ser gatillada por la expresión de un retrovirus (Pierce *et al.*, 1999; Rumpho *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en España sobre la especie congénera *Elysia timida* identificó variaciones en su desarrollo larvario, relacionadas a la época del año. Esta

información permite suponer que es posible que el ciclo de vida en *Elysia diomedea* también esté muy ligado a la estacionalidad; no obstante, este fenómeno resulta más evidente en localidades donde las estaciones son más marcadas (Marín y Ros, 1993).

En la costa del Ecuador se reconocen dos temporadas distintas en el año que podrían considerarse estaciones; 1. la época seca o no lluviosa que comprende los meses de Mayo a Noviembre-Diciembre, en la cual hay influencia de aguas frías provenientes de la corriente fría de Humboldt, que vienen desde el sur del país y la temperatura superficial del mar puede variar entre los 21°C a 25°C aproximadamente y 2. la época lluviosa que puede iniciarse a fines de Diciembre hasta Abril, la temperatura superficial del mar puede variar entre los 25°C a 28°C aproximadamente gracias a la llegada de aguas cálidas provenientes del norte (Cruz, 2009).

El registro de las fechas en las que fueron colocadas las cápsulas con los embriones permitió analizar aquellas temporadas donde hubo más actividad reproductiva, es decir mayor número de puestas; posteriormente, esta información fue empleada para detectar posibles sucesos de estacionalidad para el proceso de reproducción en *Elysia diomedea*.

Los meses en los que se reportó mayor abundancia de puestas en cautiverio fueron julio, agosto y marzo. En estos meses, se observó un promedio de 7 puestas por mes, mismas que eran colocadas durante aproximadamente cuatro días consecutivos en un solo mes (Figura 26).

Se detectaron fechas dónde se hizo necesario incrementar el esfuerzo de muestreo debido a la menor abundancia de individuos adultos en el campo y épocas

en las que se observó un gran número de individuos juveniles (1-2 cm) (Tabla 11). En ninguna de las ocasiones se encontraron puestas en ambiente natural.

Los individuos juveniles no fueron colectados para los fines de esta investigación; no obstante, los meses donde se divisaron ocasionalmente en el campo varios individuos juveniles fueron principalmente junio, julio y en menor proporción agosto, que son a su vez los meses donde se evidencia un decrecimiento sustancial de la temperatura del aire en la zona costera de Salinas, según mediciones efectuadas por el Instituto Oceanográfico de la Armada (INOCAR) durante los años 2005 y 2006 en la Península de Santa Elena, específicamente en el área de La Libertad (Hernández, 2005-2006).

Es interesante la coincidencia de estos meses con los reportados como los de mas alto nivel reproductivo en cautiverio, julio y agosto. Lamentablemente se requieren estudios más específicos para determinar si existe una estacionalidad reproductiva en *Elysia diomedea* de la costa del Ecuador.

Cabe recalcar que dentro de los apuntes ecológicos de las colectas consta que en aquellas realizadas, tanto en junio como agosto, se registró gran abundancia del alga roja filamentosa *Pterocladia* sp., siendo ésta la predominante del hábitat en dichas temporadas.

Considerando la estrecha relación que existe entre los Sacoglossa y las algas que forman parte de su dieta, es importante contemplar factores como la presencia del recurso alimenticio óptimo y su abundancia de acuerdo a la temporada del año. Esta información junto con datos complementarios de reproducción y muestreos controlados de individuos juveniles, adultos y puestas permitirán determinar si existe estacionalidad en *E. diomedea*.

Por el momento, este estudio pretende dar indicios de temporadas del año específicas de abundancia de juveniles y adultos de *E. diomedea* que puedan servir de base para investigaciones más exhaustivas sobre el ciclo biológico de esta especie en ambiente natural.

Por otro lado, la mayoría de estudios sobre el ciclo de vida de los Sacoglossa y otros opisthobranchios reportan que el periodo larvario es largo, con una duración de varias semanas. Además, en experimentos realizados en laboratorio se ha evidenciado como la metamorfosis de las larvas en juveniles se ve inducida y depende de la presencia del recurso alimenticio necesario (Trowbridge, 2002; Hubbard, 1988). No obstante, un estudio más reciente en *Elysia clarki* determinó que la dieta de la que se alimentan las larvas, es distinta a la de las babosas adultas (Curtis *et al.*, 2007).

En laboratorio se reportaron un total de 19 puestas sobre algas durante los periodos de experimentación (aproximadamente 17 meses), de las cuales 9 (47,37%) fueron colocadas sobre *Padina* sp., 7 (36,84%) sobre *Codium* sp., 2 (10,53%) sobre *Ulva* sp. y 1 (5,26%) sobre *Pterocladia* sp. Estos datos sugieren que *Elysia diomedea* en presencia de varias algas exhibe una preferencia de sustrato para colocar sus huevos (Figura 25).

A estos resultados debe añadirse que todas las puestas registradas sobre *Codium* sp. fueron colocadas en experimentos en los que sólo se les ofreció esta especie como alimento, contrario a lo que sucede en el caso de *Padina* sp., sobre la cuál los individuos colocaron los huevos únicamente en los experimentos que se les ofreció varias alternativas de dieta. Curiosamente, hubo ausencia de puestas en los acuarios que sólo contenían *Padina* sp.

Todas las puestas en *Codium* sp. fueron colocadas de forma masiva en dos días consecutivos, al parecer como una medida emergente ante las condiciones de estrés, pues pocos días después los individuos empezaron a morir.

Los resultados sugieren que la preferencia de sustrato de algunos de los individuos por el alga *Padina* sp. puede estar estimulando de alguna manera la selectividad del resto de individuos.

Estudios experimentales previos donde se mantuvo a *E. diomedea* en un acuario junto con algas del género *Padina* sp. y *Spyridia filamentosa*, reportaron que a pesar de que los individuos fueron expuestos a dos especies distintas de algas, *E. diomedea* colocó sus huevos únicamente sobre el alga *Padina* sp. (Bertsch y Smith, 1973).

Otro fenómeno que se observó en el experimento realizado por Bertsch y Smith (1973) fue que las babosas colocaron frecuentemente sus puestas sobre el vidrio de los acuarios, hecho que también se evidenció durante el desarrollo del presente estudio, incluso fue más común ver puestas en las paredes laterales de los acuarios que sobre un alga o roca determinada, por supuesto este fenómeno era más evidente en individuos sometidos a periodos de inanición. Estos resultados podrían sugerir que las babosas prefieren un sustrato liso para colocar sus huevos, lo cual podría representarles un menor esfuerzo durante el movimiento de puesta, y por lo tanto, un menor gasto energético.

7. CONCLUSIONES

La presente investigación demostró experimentalmente que *Elysia diomedea* se desarrolla de la misma manera tanto en condiciones de luz natural como en condiciones de luz artificial fluorescente, siempre que se regule su nivel de irradiación directa. Por lo tanto, se considera adecuado el empleo de luz fluorescente para estudios experimentales en laboratorio con la especie fotosintética *E. diomedea*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que *Elysia diomedea* puede sobrevivir hasta ocho semanas sin contar con una fuente de alimento, coincidiendo así con el postulado de Robert Trench y colaboradores (1969), que afirma que *E. diomedea* es una especie simbiótica con un tipo de retención funcional fotosintética de largo plazo.

Las algas *Codium sp.* y *Padina sp.* probaron ser dietas eficientes, pues al ser ofrecidas como alimento luego de un largo periodo de inanición, las babosas fueron recuperando progresivamente su coloración original, hecho que podría implicar un secuestro y renovación de plastos por parte de la babosa; no obstante, para confirmar este supuesto sería necesario desarrollar análisis complementarios más específicos, sean estos citológicos, bioquímicos, moleculares, entre otros.

Las evidencias no permitieron aseverar cuál podría ser el alga preferida como alimento por *E. diomedea* pero sí demuestran que, en cautiverio, esta especie no es especialista sino que puede optar por más de una alternativa alimenticia, al ser ofrecidas simultáneamente. Los resultados obtenidos sugieren que estas babosas pueden alimentarse de especies de algas de grupos filogenéticos distintos e incluso secuestrar sus plastos, recuperando su pigmentación y probablemente su actividad

fotosintética. Las algas que fueron consumidas por las babosas durante esta investigación fueron *Padina sp.*, *Codium sp.* y *Ulva sp.*

Durante la investigación se determinó además, que el tiempo promedio que tarda una larva de *Elysia diomedea* en eclosionar de su huevo es de 6 días. El número de ovoposiciones mensuales en la mayoría de los meses es de 1 a 3, a excepción de los meses de alto índice de ovoposiciones (marzo, julio y agosto), donde se han observado hasta 8 puestas por mes.

No se identificaron factores externos que interfirieran con los resultados obtenidos durante la investigación, por lo que se concluye que los parámetros experimentales fueron controlados adecuadamente.

Existen registros tanto en Ecuador como en otras partes del mundo de que hay un declinamiento en las poblaciones de Sacoglossa de las zonas intermareales y submareales, principalmente provocadas por contaminación y destrucción del hábitat (Clark, 1994; Terán et. al., 2004). Conocer un poco más sobre los requerimientos biológicos y el comportamiento en *Elysia diomedea* nos permitirá identificar su rol ecológico como parte importante de los ecosistemas marinos intermareales y nos dará las pautas para crear estrategias de conservación, no sólo para esta especie sino para su hábitat.

8. LITERATURA CITADA

Antizar-Ladislao, B., Turrion-Gomez, J.L. 2010. Decentralized Energy from Waste Systems. *Energies*, Special Issue: "Biofuels: Energy and Fuels, Chemical Engineering, Biotechnology and Environmental Sciences" 3(2): 194-205.

Arellano, E. 2003. Estación Oceanográfica El Pelado - Fundación CENAIM - ESPOL. Disponible en: <<http://cenaim.espol.edu.ec>>.

Astudillo, Y., Soria, C. A. 2011. Identificación y caracterización de carbohidratos y proteínas en las secreciones del dorso y del pie del molusco *Limax flavus*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 21 (1 y 2): 7-19.

Badylak, S., Kelley, K., Philips, E. 2004. Chapter IV Factors contributing to water-column light attenuation. A description of *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) from the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Phycologia* 43: 35-54.

Barraza J. 2009. Opisthobranchios de El Salvador. Gerencia de Vida Silvestre. Dirección General de Patrimonio Natural. MARN. San Salvador, El Salvador.

Barrientos, Z. 2003. Aspectos básicos sobre la clasificación, recolección, toma de datos y conservación de los moluscos. *Revista de Biología Tropical* 51 (3): 13-30.

Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.

Becerro, M., Goetz, G., Paul, V., Scheuer, P. 2001. Chemical defenses of the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and its host alga *Bryopsis* sp. *Journal of Chemical ecology* 27(11): 2287-2299.

Behrens, D., Coleman, N., Debelius, H., Kuitert, R. Nudipixel. 2010. Disponible en: <<http://www.nudipixel.net>>.

Bergh, R. 1894. Reports on the dredging operations off the West Coast of Central America to the Galapagos, to the West Coast of Mexico, and in the Gulf of California, in charge of Alexander Agassiz, carried on by the U.S. Fish Commission Steamer "Albatross", during 1891, Lieut. Commander Z.L.Tanner, U.S.N., Commanding. XIII. Die Opisthobranchien. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 25(10): 125-233.

Bertsch, H. 2007. Ten-year baseline study of annual variation in the opisthobranch (Mollusca: Gastropoda) populations at Bahía de los Ángeles, Baja California, México. En: (G.D. Danemann y E. Ezcurra, eds.), *Bahía de los Ángeles: Recursos naturales y comunidad*. Pronatura Noroeste.

Bertsch, H., Smith, A. 1973. Observations on Three Opisthobranchs (Mollusca: Gastropoda) of the La Paz Area, Baja California, Mexico. *The Southwestern Naturalist* 18 (2): 165-176.

Bhosale, S., Jagtap, T., Naik, C. 1999. Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 147 (3): 133–138.

Blackmore, S., Tootill, E. 1984. *The Penguin Dictionary of Botany*. Harmondsworth, Penguin. 400 pps.

Brandley, B. 1984. Aspects of the Ecology and Physiology of *Elysia cf. furvacauda* (Mollusca: Sacoglossa). *Bulletin of Marine Science* 34 (2): 207–219.

Burghardt, I., Stemmer, K., Wägele, H. 2008. Symbiosis between *Symbiodinium* (Dinophyceae) and various taxa of Nudibranchia (Mollusca: Gastropoda), with analyses of long-term retention. *Organisms Diversity & Evolution* 8 (1): 66–76.

Carefoot, T.H. 1980. Studies on the nutrition and feeding preferences of *Aplysia*: development of an artificial diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 42(3): 241-252.

Carrillo, S., Casas, M., Ramos, F., Pérez-Gil, F., Sánchez, I. 2002. Algas marinas de Baja California Sur, México: valor nutrimental. *ALAN* [online] 52(4), pp.400-405. [citado 2012-06-23]. Disponible en: <<http://www.scielo.org.ve>>.

Casalduero, F., Muniain, C. 2008. The role of kleptoplasts in the survival rates of *Elysia timida* (Risso, 1818): (Sacoglossa: Opisthobranchia) during periods of food shortage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357 (2): 181–187.

Cimino, G., Ghiselin, M. 1998. Chemical defense and evolution in the Sacoglossa (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia). *Chemoecology* 8 (2): 51–60.

Clark, K. 1992. Plant-like animals and animal-like plants: symbiotic coevolution of ascoglossan (sacoglossan) molluscs, their algal prey, and algal plastids. In (W. Reisser, ed.) 515-530 p. *Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*. Biopress Ltd., Bristol, U.K.

Clark, K.B. 1994. Ascoglossan (=Sacoglossa) molluscs in the Florida keys; rare marine invertebrates at special risk. *Bulletin of marine science*, 54(3): 900-914.

Clark, K. B., and M. Busacca. 1978. Feeding specificity and chloroplast retention in four tropical Ascoglossa, with a discussion of the extent of chloroplast symbiosis and the evolution of the order. *Journal of Molluscan Studies* 44: 272–282.

Clark, K., Defreese, D., 1987. Population ecology of Caribbean ascoglossa (mollusca: opisthobranchia): a study of specialized herbivores. *American Malacological Bulletin* 5: 259–280.

Clark, K., Jensen, K., Stirts, H., Fermin, C. 1981. Chloroplast symbiosis in an non-elysiid mollusc, *Costasiella lilianae* marcus (Hermaeida: Ascoglossa (=Sacoglossa): Effects of temperature, light intensity, and starvation on carbon fixation rate. *Biology Bulletin* 160: 43-54.

Cruz, M. 2009. Variación de la malacofauna bentónica intermareal y submareal de la Bahía de Santa Elena, Ecuador, entre el 2006 - 2007. *Acta Oceanográfica del Pacífico* 15(1).

Cueto, M., D'Croz, L., Maté, J., San-Martín, A., Darias, J. 2005. Elysiapyrones from *Elysia diomedea*. Do Such Metabolites Evidence an Enzymatically Assisted Electrocyclization Cascade for the Biosynthesis of Their Bicyclo (4.2.0) octane Core? *Organic Letters* 7(3): 415-418.

Curtin, J., Cotter, T. 2003. Historical perspectives. *Essays in Biochemistry* 39: 1-10.

Curtis, N. E., Massey, S. E., Pierce, S. K. 2006. The symbiotic chloroplasts in the sacoglossan *Elysia clarki* are from several algal species. *Invertebrate Biology* 125 (4): 336–345.

Curtis, N. E., Schwartz, J. A., Pierce, S. K. 2010. Ultrastructure of sequestered chloroplasts in sacoglossan gastropods with differing abilities for plastid uptake and maintenance. *Invertebrate Biology* 129(4): 297–308.

Curtis, N., 2006. The identification of functional, sequestered, symbiotic chloroplasts in *Elysia clarki*: A crucial step in the study of horizontally transferred, nuclear algal genes. Tesis de Doctorado. University of South Florida, Tampa, United States of America.

Curtis, N., Pierce, S., Massey, S., Schwartz, J., Mangel, T. 2007. Newly metamorphosed *Elysia clarki* juveniles feed on and sequester chloroplasts from algal species different from those utilized by adult slugs. *Marine Biology* 150 (5): 797–806.

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27 (1): 1–20.

Davies-Coleman, M., Garson, M. 1998. Marine polypropionates. *Natural product reports* 15 (5): 477–493.

Díaz-Marrero, A., Cueto, M., D'Croz, L., Darias, J. 2008. Validating an Endoperoxide as a Key Intermediate in the Biosynthesis of Elysiapyrones. *Organic Letters* 10 (14): 3057–3060.

Dieter, H. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Scientia Marina* 60 (1): 243–248.

Encyclopedia Britannica Group. 2010. Brown algae. Encyclopedia Britannica Online. Disponible en: <<http://www.britannica.com>> (Consulta marzo 2012).

Evertsen, J., Burghardt, I., Johnsen, G., Wägele, H. 2007. Retention of functional chloroplasts in some sacoglossans from the Indo-Pacific and Mediterranean. *Marine Biology* 151 (6): 2159-2166.

Evertsen, J., Johnsen, G. 2009. In vivo and in vitro differences in chloroplast functionality in the two north Atlantic sacoglossans (Gastropoda, Opisthobranchia) *Placida dendritica* and *Elysia viridis*. *Marine Biology* 156: 847–859.

Fontana, A., Ciavatta, M.L., DeSouza, L., Mollo, E., Naik, C.G., Parameswaran, P.S., Wahidullah, S., Cimino, G. 2001. Selected chemo-ecological studies of marine opisthobranchs from Indian coasts. *Journal of Indian Institute of Science* 81: 403–415.

Gavagnin, M., Mollo, E., Montanaro, D., Ortea J., Cimino, G. 2000. Chemical studies of Caribbean sacoglossans dietary relationships with green algae and ecological implications. *Journal of Chemical Ecology* 26 (7): 1563-1578.

Gianguzza P., Airoidi, L., Chemello, R., Todd, C. D., Riggio, S. 2002. Feeding preferences of *Oxynoe olivacea* (Opisthobranchia: Sacoglossa) among three *Caulerpa* species *Journal of Molluscan Studies* 68(3): 289-290.

Giménez-Casaldueiro, F., Muniain, C., 2006. Photosynthetic activity of the solarpowered lagoon mollusc *Elysia timida* (Risso, 1818) (Opisthobranchia: Sacoglossa). *Symbiosis* 41, 151–158.

Giménez-Casaldueiro, F., Muniain, C., González, M., Garrote, A. 2011. *Elysia timida* (Risso, 1818) three decades of research. *Animal Biodiversity and Conservation* 34 (1): 217–227.

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

Grant, B., Borowitzca, M. 1984. Changes in isolated chloroplasts in *Codium fragile* and *Caulerpa filiformis* in response to osmotic shock and detergent treatment. *Protoplasma* 120 (3): 155-164.

Greene, T. 1998. *Marine Biology*. 2nd Edition. Amsco School Pubns Inc.

Greene, R. W. 1970. Symbiosis in sacoglossan opisthobranchs: functional capacity of symbiotic chloroplasts. *Marine Biology* 7 (2): 138-142.

Guiry, M., Guiry, G. 2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponible en <<http://www.algaebase.org>> (Consulta Noviembre, 2011).

Gutiérrez, G. 2004. Composiciones a base de algas *Padina*, o de sus extractos, y sus aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o en el cultivo de moluscos y artrópodos. Oficina Española de patentes y marcas. N° 2 220 909.

Händeler K., Grzybowski, Y. P., Krug, P. J., Wägele, H. 2009. Functional chloroplasts in metazoan cells - a unique evolutionary strategy in animal life. *Frontiers in Zoology* 6: 28.

Händeler, K., Wägele, H. 2007. Preliminary study on molecular phylogeny of sacoglossa and a compilation of their food organisms. *Bonner Zoologische Beiträge* 55: 231-254.

Händeler, K., Wägele, H., Wahrmund, U., Rüdinger, M., Knoop, V. 2010. Slugs' Last Meals: Molecular Identification of Sequestered Chloroplasts from Different Algal Origins in Sacoglossa (Opisthobranchia, Gastropoda). *Molecular Ecology Resources* 10 (6): 968–978.

Hanelt, D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Scientia Marina* 60: 343–348.

Hanten, J., Pierce, S. 2001. Synthesis of several light-harvesting complex I polypeptides is blocked by cycloheximide in symbiotic chloroplasts in the sea slug, *Elysia chlorotica* (Gould): a case for horizontal gene transfer between alga and animal?. *The Biological Bulletin* 201 (1): 34–44.

Hawes, C., Cobbs, A. 1980. The effects of starvation on the symbiotic chloroplasts in *Elysia viridis*: a fine structural study. *New Phytologist* 84: 375-379.

Hay, M., Pawlik, J., Duffy, J., Fenical, W. 1989. Seaweed-herbivore-predator interactions: host-plant specialization reduces predation on small herbivores. *Oecologia* 81 (3): 418–427.

Hernández, F. 2005-2006. Análisis de la variabilidad climática de la costa ecuatoriana. *Acta Oceanográfica del Pacífico* 13 (1): 1-6.

Hickman J., C.P., Roberts, L.S. y Larson, A., Zoología. Principios integrales. (10ª ed., 4ª en castellano). McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, 1999.

Hickman, C. P. 2009. Principios Integrales de Zoología. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., Madrid, España. 936 pp.

Hinde, R., Smith, D. 1975. The role of photosynthesis in the nutrition of the mollusc *Elysia viridis*. Biological Journal of the Linnean Society 7: 161–171.

Hubbard, E. 1988. Larval Growth and the Induction of Metamorphosis of a Tropical Sponge-Eating Nudibranch. Journal of Molluscan Studies 54 (3), 259–269.

Ireland, C., Faulkner, D. 1981. The metabolites of the marine molluscs *Tridachiella diomedea* and *Tridachia crispata*. Tetrahedron 37(1): 233-240.

Ireland, C., Scheuer, P. 1979. Photosynthetic Marine Mollusks: In Vivo ¹⁴C Incorporation into Metabolites of the Sacoglossan *Placobranchius ocellatus*. Science 205 (4409): 922–923.

Jensen, K. 1980. A review of sacoglossan diets, with comparative notes on radular and buccal anatomy. Malacological Review 13: 55–77.

Jensen, K. 1981. Observations on feeding methods in some Florida ascoglossans. Journal of Molluscan Studies 47(2): 190-199.

Jensen, K. 1986. Feeding behaviour of some Hong Kong Ascoglossa (Mollusca, Opisthobranchia). En Proceedings of the Second International Marine Biological Workshop: The Marine Flora & Fauna of Hong Kong and Southern China, Hong Kong, 961–977.

Jensen, K. 1989. Learning as a factor in diet selection by *Elysia viridis* (Montague) (Opisthobranchia). Journal of Molluscan Studies 55 (1): 79–88.

Jensen, K. 1990. Feeding Behaviour of some Hong Kong Ascoglossa (Mollusca: Opisthobranchia). En: Proceedings of the Second International Marine biological workshop: The marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China, Hong Kong, 1986. (B. Morton, ed.) 961-97, Hong Kong University Press, Hong Kong.

Jensen, K. 1991. Comparison of alimentary systems in shelled and non-shelled Sacoglossa (Mollusca, Opisthobranchia). Acta Zoologica 72 (3): 143–150.

Jensen, K. 1993a. Morphological adaptations and plasticity of radular teeth of the Sacoglossa (=Ascoglossa) (Mollusca: Opisthobranchia) in relation to their food plants. Biological Journal of the Linnean Society of London, 48, 135-155.

Jensen, K. 1993b. Evolution of the buccal apparatus and diet radiation in the Sacoglossa (Opisthobranchia). Bulletino Malacologico 29 (5-8): 147-172.

Jensen, K. 1997. Evolution of the Sacoglossa (Mollusca, Opisthobranchia) and the ecological associations with their food plants. Evolutionary Ecology 11: 301-335.

Jensen, K. 2007. Biogeography of the Sacoglossa (Mollusca, Opisthobranchia). *Bonner zoologische Beiträge* 55 (3/4): 255–281.

Kathe, Z. 2007. Biogeography of the Sacoglossa (Mollusca , Opisthobranchia). *Bonner zoologische Beiträge* 55, 255-281

Kawaguti, S., Yamasu, T. 1965. Electron microscopy on the symbiosis between an elysioid gastropod and chloroplasts of a green alga. *Biological Journal of Okayama University* 11: 57-65.

Kirk, John T. O. 2011. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Third edition. Cambridge University Press. United Kingdom. 662 pp.

Klochkova, T., Han, J., Kim, J., Kim, K., Kim, G. 2010. Feeding specificity and photosynthetic activity of Korean sacoglossan mollusks. *Algae* 25 (4): 217–227.

Koreeda, M., Akagi, H. 1980. A convenient synthesis of substituted γ -pyrones. *Tetrahedron Letters* 21: 1197 – 1200.

Ksebati, M., Schmitz, F. 1985. Tridachiapyrones: propionate-derived metabolites from the sacoglossan mollusk *Tridachia crispata*. *The Journal of Organic Chemistry* 50 (26): 5637–5642.

MacFadden, G. I. 2001. Primary and Secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology* 37: 951-959.

Maeda T, Kajita T, Maruyama T, Hirano Y. 2010. Molecular phylogeny of the sacoglossa, with a discussion of gain and loss of kleptoplasty in the evolution of the group. *Biological Bulletin* 219(1): 17-26.

Maffione R. A., 2001. Evolution and Revolution in Measuring Ocean Optical Properties. *Oceanography* 14(3): 9-14.

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

Marín, A., Ros, J. 1993. Ultrastructural and Ecological Aspects of the Development of Chloroplast Retention in the Sacoglossan Gastropod *Elysia timida*. *Journal of Molluscan Studies* 59 (1): 95–104.

Marín, A., Ros, J. 2004. Chemical defense in Sacoglossa Opisthobranchs: Taxonomic trends and evolutive implications. *Scientia Marina* 68 (1): 227-241.

Mercado, J., Gordillo, M., Javier, L., Figueroa, F., Niell, L., Xavier, F. 1998. External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 221 (2): 209-220.

Middlebrooks, M., Pierce, S., Bell, S. 2011. Foraging Behavior under Starvation Conditions Is Altered via Photosynthesis by the Marine Gastropod, *Elysia clarki*. PLoS ONE 6 (7): e22162.

Miller, M. 2010. Slug Site. Disponible en: <<http://slugsite.tierranet.com>> (Consulta marzo 2010).

Mondy, W., Pierce, S. 2003. Apoptotic-like morphology is associated with annual synchronized death in kleptoplastic sea slugs (*Elysia chlorotica*). Invertebrate Biology 122 (2): 126–137.

Morel, A. 1974: Optical properties of pure water and pure seawater. Chap. 1. En: Optical Aspects of Oceanography. (Jerlov y Nielsen, eds.), pp. 1-24. Academic Press, New York.

Mujer, C. V., D. L. Andrews, J. R. Manhart, S. K. Pierce, M. E. Rumpho. 1996. Chloroplast genes are expressed during intracellular symbiotic association of *Vaucheria litorea* plastids with the sea slug *Elysia chlorotica*. Proceedings of the National Academy of Science USA 93 (22): 12333–12338.

Muniain, C., Marín, A., Penchaszadeh, P. E. 2001. Ultrastructure of the digestive gland from the larval and adult stages of the sacoglossan *Elysia patagonica* Muniain and Ortea, 1997 . Marine Biology 139: 687-695.

Muscatine, L., Greene, R. W. 1973. Chloroplasts and algae as symbionts in molluscs. International Review of Cytology 36:137-69.

Nakamura, K. 2007. Especies bentónicas de Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) presentes en el litoral del norte peruano. Revista Peruana de Biología 13 (3): 255 – 257.

Nuijen, B., Bouma, M., Manada, C., Jimeno, J., Lazaro, L., Bult, A., Beijnen, J. 2001. Compatibility and Stability of the Investigational Polypeptide Marine Anticancer Agent Kahalalide F in Infusion Devices. Investigational New Drugs 19 (4): 273–281.

Ortiz, J. 2011. Composición nutricional y funcional de las algas clorofíceas chilenas: *Codium fragile* y *Ulva lactuca*. (Universidad de Chile, ed.), Santiago de Chile.

Paletta, M. 2008. The New Marine Aquarium: Step-by-step setup & Stocking guide. T.F.H Publications Inc. New Jersey, USA.

Pelletreau, K. N., Bhattacharya, D., Price, D. C., Worful, J. M., Moustafa, A., Rumpho, M. E. 2011. Sea slug kleptoplasty and plastid maintenance in a metazoan. Plant Physiology 155(4): 1561-1565.

Pierce, S., Massey, S., Hanten, J., Curtis, N. 2003. Horizontal Transfer of Functional Nuclear Genes Between Multicellular Organisms. *The Biological Bulletin* 204 (3): 237–240.

Pierce, S., Maugel, T., Rumpho, M., Hanten, J., Mondy, W. 1999. Annual viral expression in a sea slug population: life cycle control and symbiotic chloroplast maintenance. *The Biological Bulletin* 197 (1): 1-6.

Pizarro, C. 2003. Evaluación de una técnica de ensilado para el alga *Macrocystis pyrifera* y observación de su consumo por de abalon rojo (*Haliotis rufescens*). Tesis de licenciatura. Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

Prince, J., LeBlanc, W., Maciá, S. 2004. Design and analysis of multiple choice feeding preference data. *Oecologia* 138: 1–4.

Rahat, M., Monselise, B. 1979. Photobiology of the chloroplast hosting mollusc *Elysia timida* (opisthobranchia). *Journal of Experimental Biology* 79: 225-233.

Rebasa, P. 2005. Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *Cirugía Española* 78 (4): 222-30.

Reef Central Group. 2009. Photosynthesis and the Reef Aquarium. *Reef keeping Magazine* 8 (3). Disponible en: <<http://www.reefkeeping.com>> (Consulta febrero 2012).

Riofrío Briceño, M., Chavarría Viteri, J. 2004. Caracterización termohalina de la estación oceanográfica El Pelado. CENAIM-ESPOL.

Riofrío, M., Chavarría, J. 2009. Caracterización termohalina de la estación oceanográfica El Pelado. Tesis de Grado-FIMCBOR. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Santa Elena, Ecuador.

Rosas, C. D. 2007. Pigmentos fotosintéticos en la columna de agua determinados mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas (HPLC-RP): variabilidad espacio-temporal y efectos de radiación uv. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Rudman, B. 2010. Sea Slug Forum. Australian Museum. Disponible en: <<http://seaslugforum.net>> (Consulta: abril 2010).

Rudman, W., 2003. *Elysia leucolegnote* - anatomy. Message in: Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney. Disponible en: <<http://www.seaslugforum.net>>. (Consulta: abril 2009).

Rudman, W.B., 2006 (Jun 5). Comentario en *Elysia diomedea* breeding in home aquarium por Matt Pedersen. Mensaje en: Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney. Disponible en: <<http://www.seaslugforum.net/find/16793>>.

Rumpho, M. E., Summer, E. J., Green, B. J., Fox, T. C., Manhart, J. R. 2001. Mollusc/algal chloroplast symbiosis: how can isolated chloroplasts continue to function for months in the cytosol of a sea slug in the absence of an algal nucleus? *Zoology* 104: 303–312.

Rumpho, M., Summer, E., Manhart, J. 2000. Solar-Powered Sea Slugs. *Mollusc/Algal Chloroplast Symbiosis. Plant Physiology* 123 (1): 29-38

S. Weaver, S., Clark, K. B. (1981): Light intensity and color preferences of five ascoglossan (=sacoglossan) molluscs (Gastropoda: Opisthobranchia): A comparison of chloroplast symbiotic and aposymbiotic species, *Marine Behaviour and Physiology*, 7:4, 297-306

Schmitt, V., Wägele, H. 2011. Behavioral adaptations in relation to long-term retention of endosymbiotic chloroplasts in the sea slug *Elysia timida* (Opisthobranchia, Sacoglossa). *Thalassas* 27 (2): 225-238.

Soule, K. M. 2007. Light-regulated photosynthetic gene expression and enzyme activity in the heterokont alga *Vaucheria litorea* and its symbiotic partner the sacoglossan mollusc *Elysia chlorotica*. Tesis de Maestría. University of Maine, Maine, USA.

Steinberg, P., Paul, V. 1990. Fish feeding and chemical defenses of tropical brown algae in Western Australia. *Marine Ecology Progress Series* 58 (3): 253–259.

Stoebe, B., Maier, U. 2002. One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219: 123-130.

Taylor, D. L. 1968. Chloroplasts as symbiotic organelles in the digestive gland of *Elysia viridis* [Gastropoda: Opisthobranchia]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 48: 1–15.

Terán, M., Campos, F., Clark, K., Ruiz, D., Guarderas, P., Jiménez, P., Denking, J., Ortiz, E., Suárez, C. 2004. Evaluación ecorregional pacífico ecuatorial: componente marino. Portafolio de Sitios Prioritarios para la Conservación dentro de la Unidad de Planificación Ecorregional Pacífico Ecuatorial: Componente Marino. The Nature Conservancy. Quito – Ecuador.

Teugels, B., Bouillon, S., Veuger, B., Middelburg, J., Koedam, N. 2008. Kleptoplasts mediate nitrogen acquisition in the sea slug *Elysia viridis*. *Aquatic Biology* 4: 15–21.

Thibaut, T., Meinesz, A., Amade, P., Charrier, S., De Angelis, K., Ierardi, S., Mangialajo, L., Melnick, J., Vidal, V. 2001. *Elysia subornata* (Mollusca) a potential control agent of the alga *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81 (3): 497-504.

Thompson, T., Jarman, G. 1989. Nutrition of *Tridachia crispata* (Mörch) (sacoglossa). *Journal of Molluscan Studies* 55 (2): 239–244.

Trench, R. K. 1975. Of 'leaves that crawl': functional chloroplasts in animal cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 29: 229-65.

Trench, R., Greene, R., Bystrom, B. 1969. Chloroplasts as functional organelles in animal tissues. *The Journal of Cell Biology* 42 : 404-417.

Trowbridge, C. D. 1991. Diet Specialization Limits Herbivorous Sea Slug's Capacity to Switch Among Food Species. *Ecology* 72:1880–1888.

Trowbridge, C. 1992. Mesoherbivory: The ascoglossan sea slug *Placida dendritica* may contribute to the restricted distribution of its algal host. *Marine ecology progress series*. Oldendorf 83 (2): 207–220.

Trowbridge, C. 2001. Re: *Elysia diomedea* feeding requirements. [Message in] Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney. Disponible en <<http://www.seaslugforum.net/find/4517>>.

Trowbridge, C. 2002. Northeastern Pacific sacoglossan opisthobranchs: Natural history review, bibliography, and prospectus. *The Veliger* 45 (1): 1-24.

Trowbridge, C., Todd, C. 2001. Host-plant change in marine specialist herbivores: ascoglossan sea slugs on introduced macroalgae. *Ecological Monographs* 71 (2): 219–243.

Tsuda, R. T, Abbott, I. A. 1985. Collection, handling, preservation and logistics. En: *Ecological Field Methods: Macroalgae. Handbook of Phycological Methods*. (Littler, M.M. and Littler, D.S., eds.), 617 pp. Cambridge University Press, New York.

Vieira, S., Calado, R., Coelho, H., Serôdio, J. 2009. Effects of light exposure on the retention of kleptoplastic photosynthetic activity in the sacoglossan mollusc *Elysia viridis*. *Marine Biology* 156 (5): 1007–1020.

Wägele, H., Deusch, O., Händeler, K., Martin, R., Schmitt, V., Christa, G., Pinzger, B., Gould, S. B., Dagan, T., Klusmann-Kolb, A., Martin W. 2011. Transcriptomic Evidence That Longevity of Acquired Plastids in the Photosynthetic Slugs *Elysia timida* and *Plakobranhus ocellatus*. Does Not Entail Lateral Transfer of Algal Nuclear Genes. *Molecular Biology and Evolution* 28 (1): 699-706.

Wassef, E.A. 2005. Alternative protein sources for fish feeds in Egypt. *Cahiers Options Méditerranéennes. Mediterranean Fish Nutrition* 63: 127-142.

Wassef, E.A., El-Sayed, A.F.M., Kandeel, K.M., Sakr, E.M. 2005. Evaluation of *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) meals as additives to gilthead seabream *Sparus aurata* diets. Egyptian Journal of Aquatic Research 31, Special Issue, 321-332.

Waugh, G. R., K. B., Clark. 1986. Seasonal and geographic variation in chlorophyll level of *Elysia tuca* (Ascoglossa: Opisthobranchia). Marine Biology 92 (4): 483–487.

Weaver, S., Clark, K. 1981. Light intensity and color preferences of five ascoglossan (sacoglossan) molluscs (Gastropoda: Opisthobranchia): A comparison of chloroplast symbiotic and aposymbiotic species. Marine Behaviour and Physiology 7 (4): 297–306.

Williams, L. M., Cobbs, A. H. 1989. Isolation of functional chloroplasts from the sacoglossan mollusc *Elysia viridis* Montague. New Phytologist 113: 153-160.

9. FIGURAS

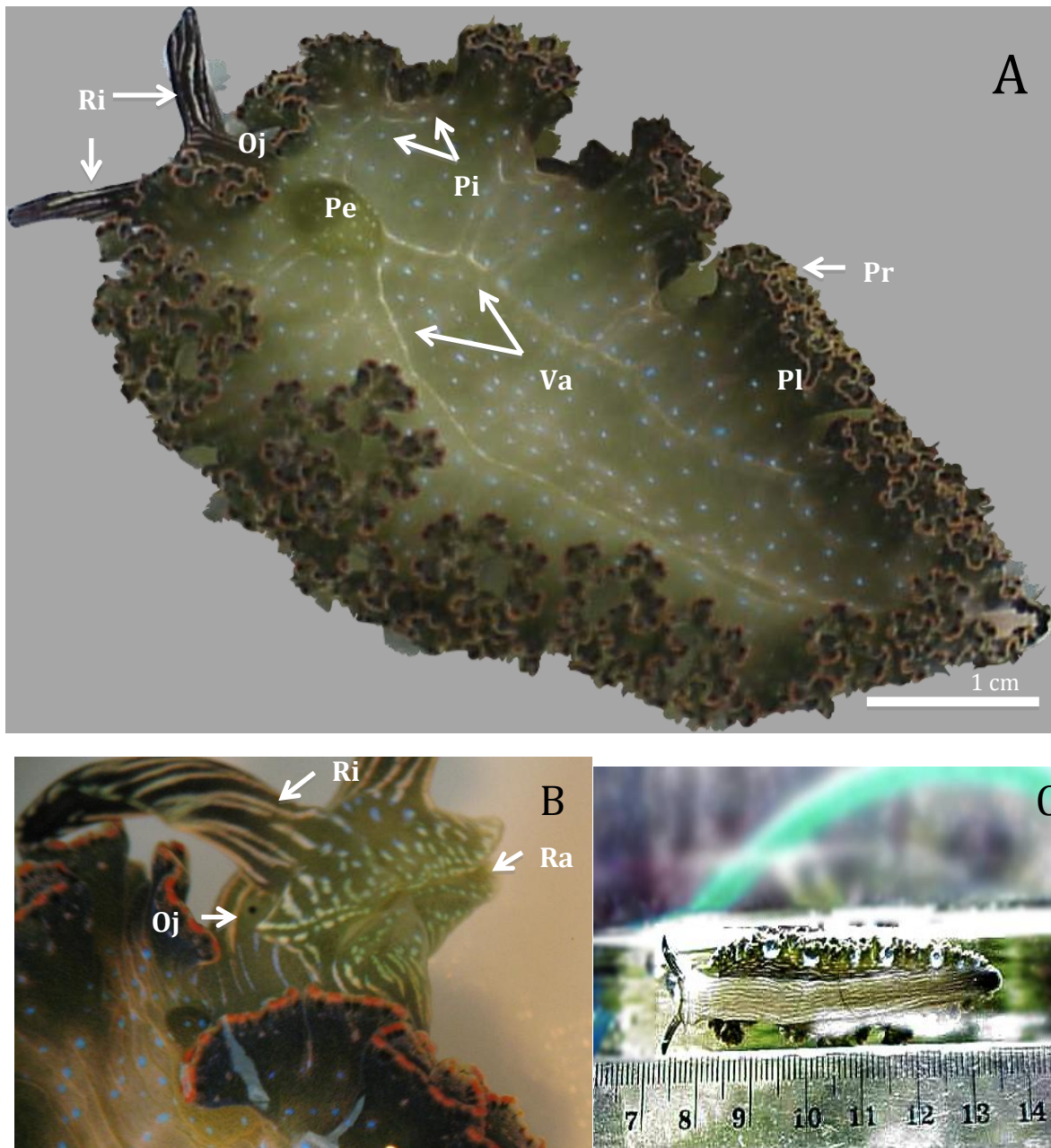


Figura 1. Anatomía externa de *Elysia diomedea*. Ri. Rinóforos, Oj. Ojos, Pe. Pericardium, Pr. Propodium, Pl. Plastos, Pi. Pigmentos iridiscentes, Va. Vasos. Ra. Rádula. A. Vista dorsal. B. Vista anterior (cabeza). C. Vista ventral.

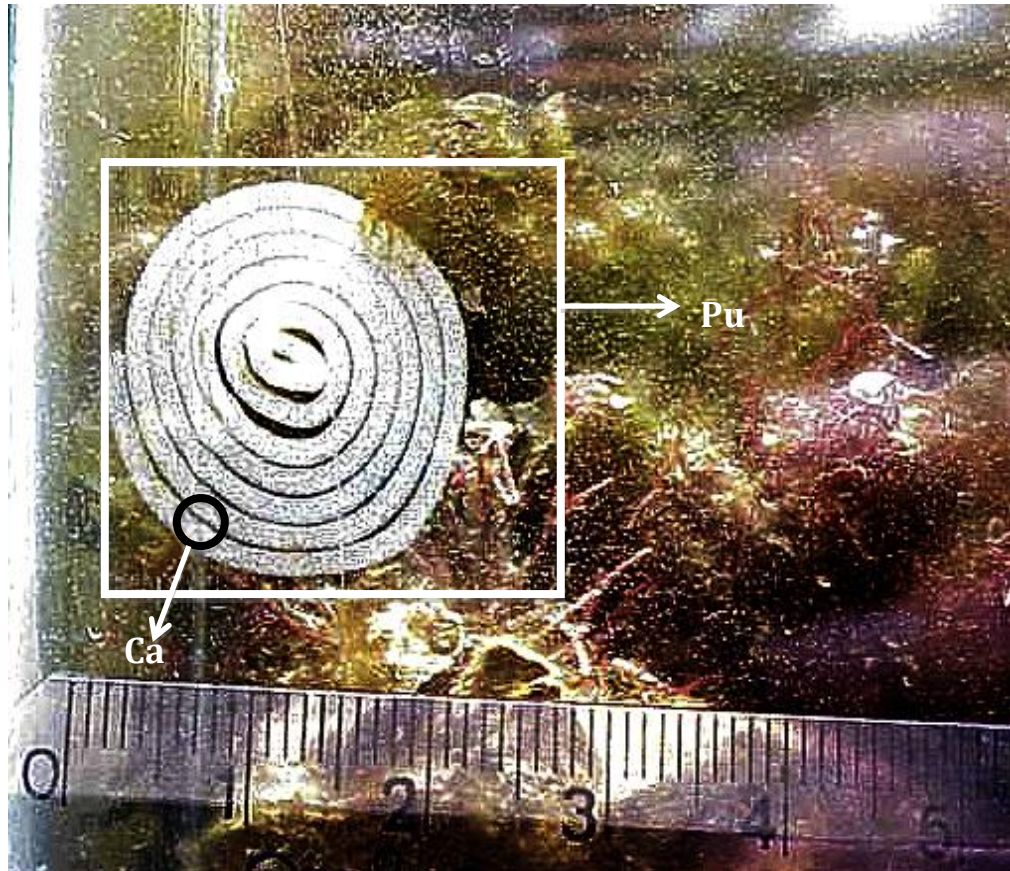


Figura 2. Puesta de *Elysia diomedea*. Puesta de *Elysia diomedea* conteniendo embriones empaquetados en cápsulas. Aproximadamente 2cm de diámetro. Pu. Puesta. Ca. Cápsulas con embriones.

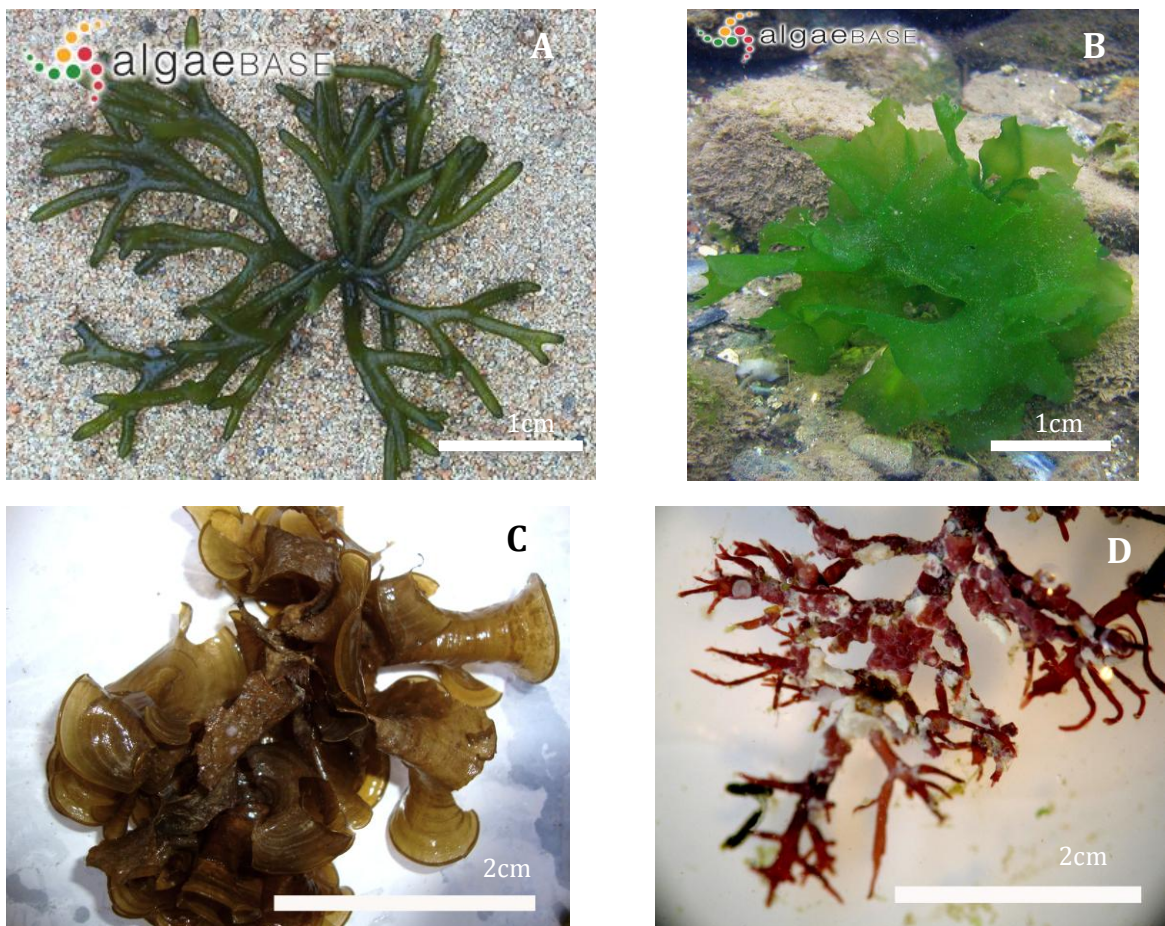


Figura 3. Especies de algas probadas durante la investigación. A. *Codium fragile* (Guiry, 2010). B. *Ulva lactuta* (Guiry, 2010). C. *Padina* sp. D. *Pterocladia* sp.

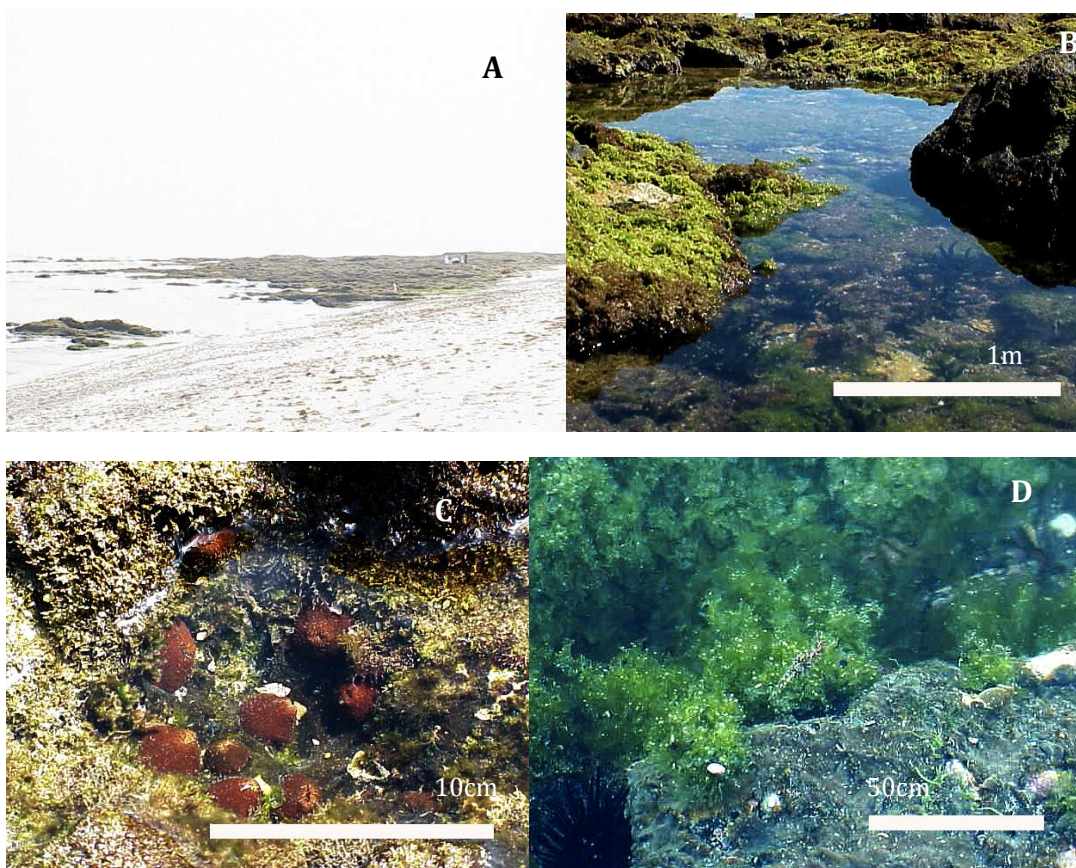


Figura 4. Características del área de estudio. Localidad 1: Salinas. A. Vista de la playa rocosa en horas de marea baja. B. Pozas intermareales con variedad de algas e invertebrados. C. Anémonas. D. Algas y erizos de mar.

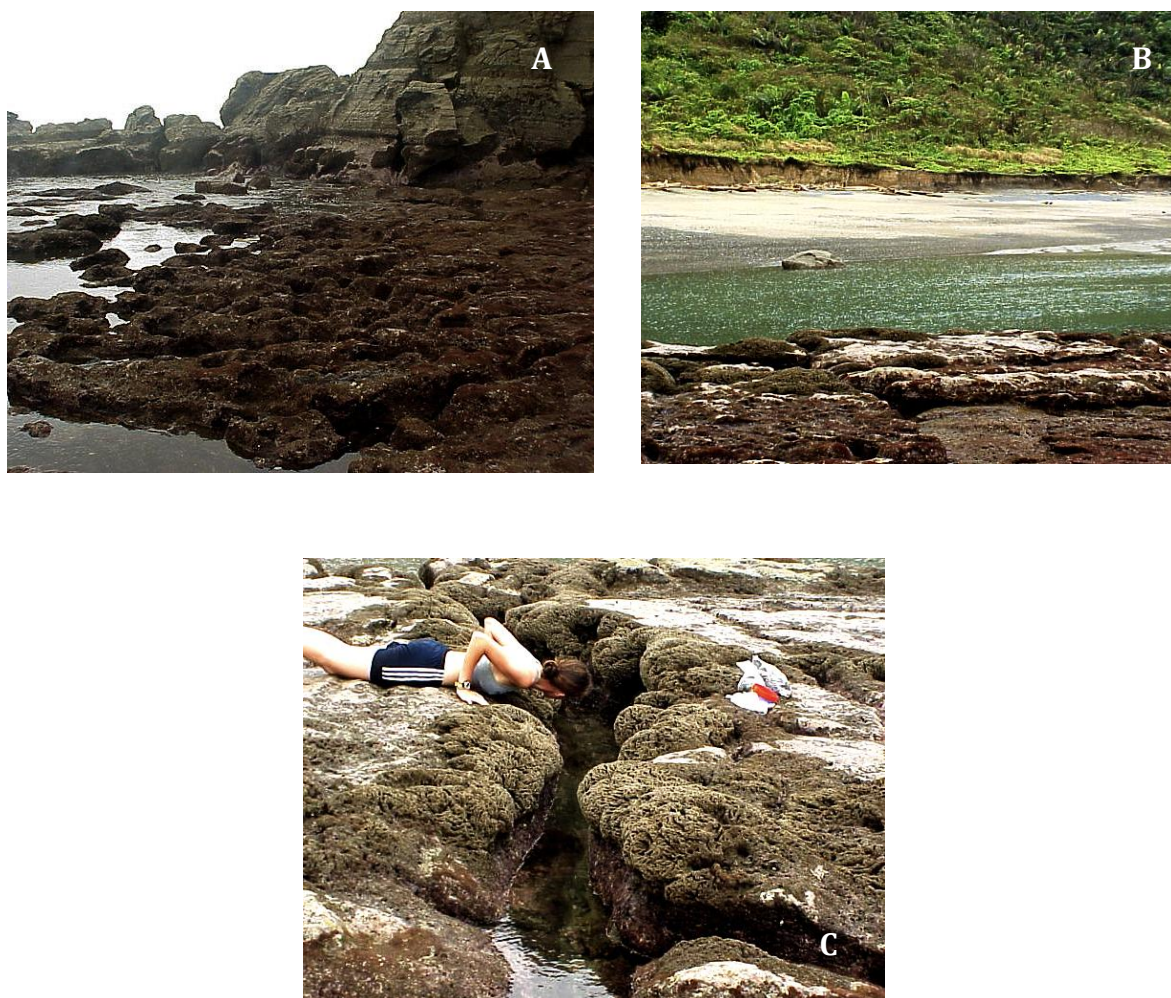


Figura 5. Características del área de estudio. Localidad 2: Tongorachi. A. Vista de la playa rocosa en horas de marea baja. B. Pozas arenosas intermareales. C Pozas rocosas intermareales.



Figura 6. Método de colección y transporte de babosas marinas. Recipientes plásticos con agua de mar natural, individuos de *Elysia diomedea* y algas extraídas del hábitat.

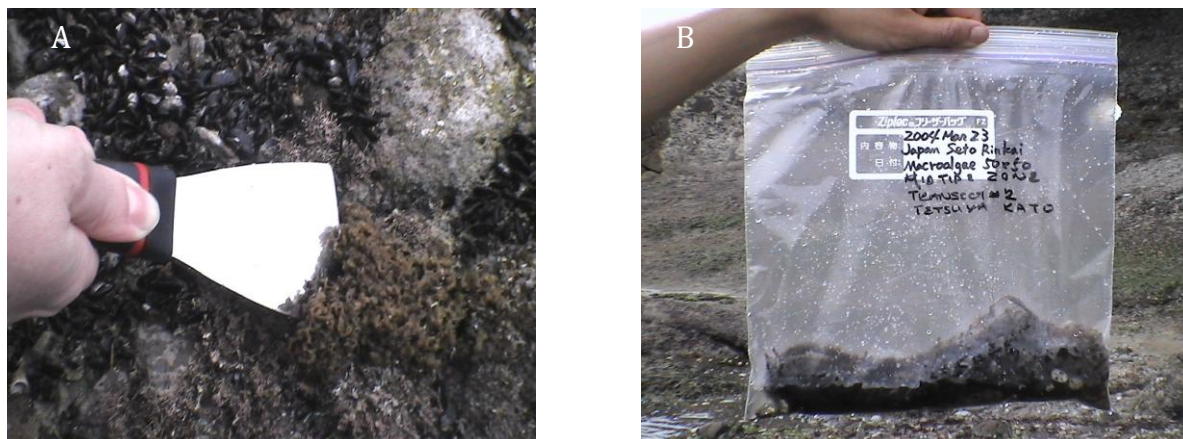
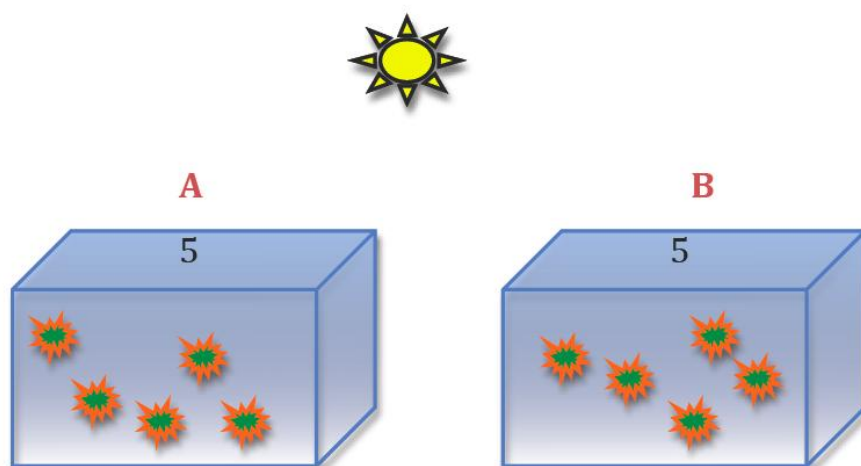
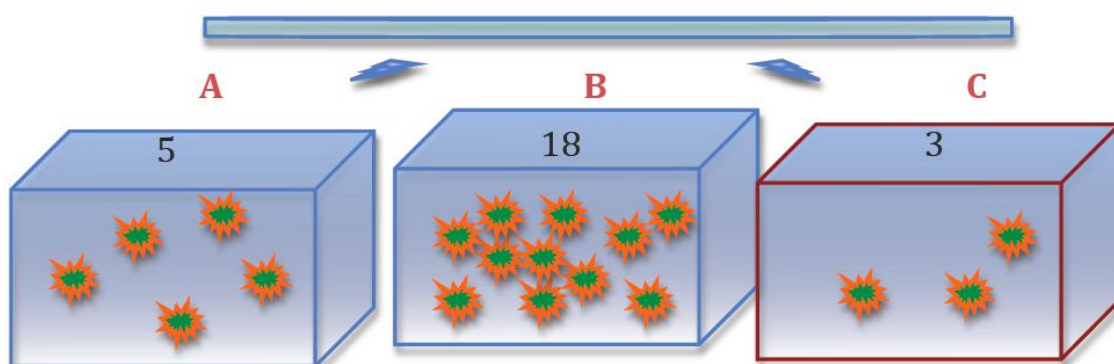


Figura 7. Métodos de colección y transporte de algas marinas. A. Técnica de raspado, B. Transporte de algas en fundas plásticas herméticas.

1



2



Elysia diomedea

Figura 8. Diseño experimental empleado para evaluar el comportamiento y supervivencia de *Elysia diomedea* bajo distintas condiciones de luz. En la parte superior consta el diagrama de las peceras A y B expuestas a iluminación natural, donde se incluyeron 5 sujetos experimentales en cada una. En la parte inferior constan las tres peceras A, B y C expuestas a luz artificial fluorescente que incluyeron 5 , 18 y 3 individuos, respectivamente.

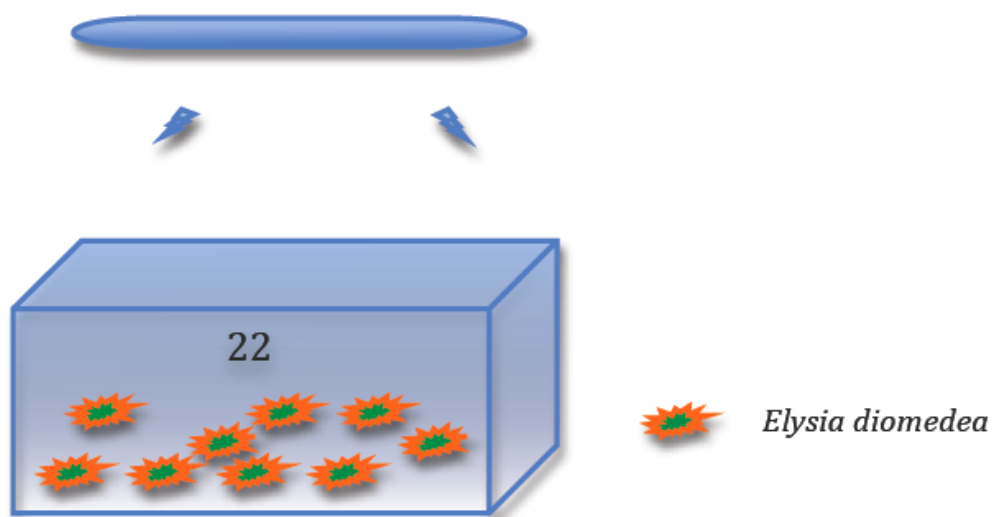


Figura 9. Diseño experimental para evaluar el comportamiento y supervivencia de *Elysia diomedea* bajo luz artificial. Se emplearon en el experimento 22 individuos de *Elysia diomedea*, mantenidos en un solo acuario, bajo luz fluorescente.

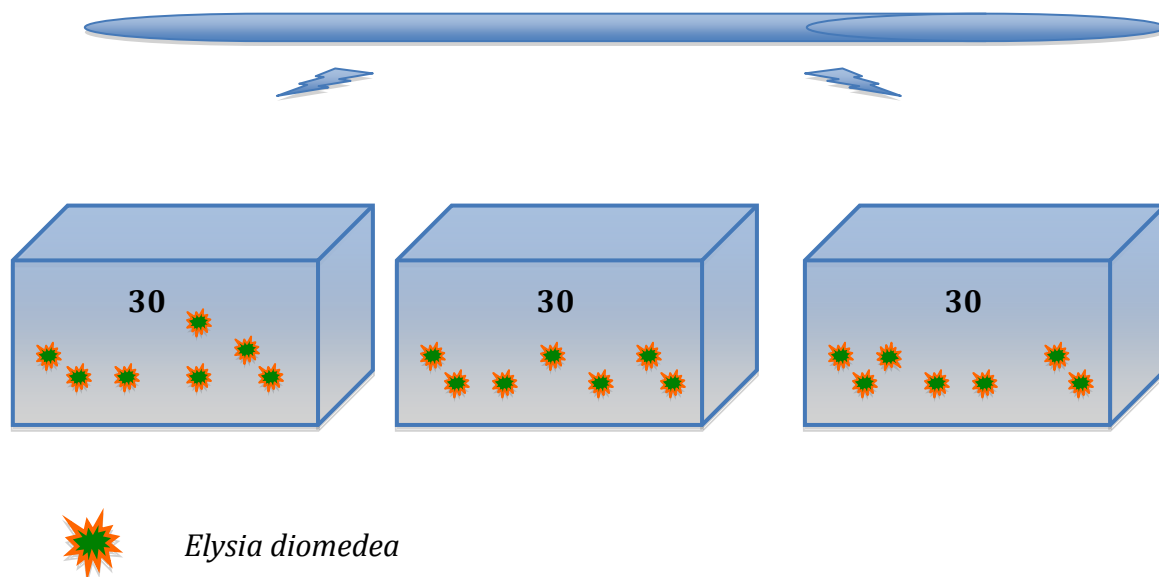


Figura 10. Diseño experimental empleado para evaluar la supervivencia de *Elysia diomedea* en condiciones de inanición. El diagrama representa los tres acuarios empleados, con 30 individuos de *Elysia diomedea* cada uno, probados bajo luz artificial fluorescente.

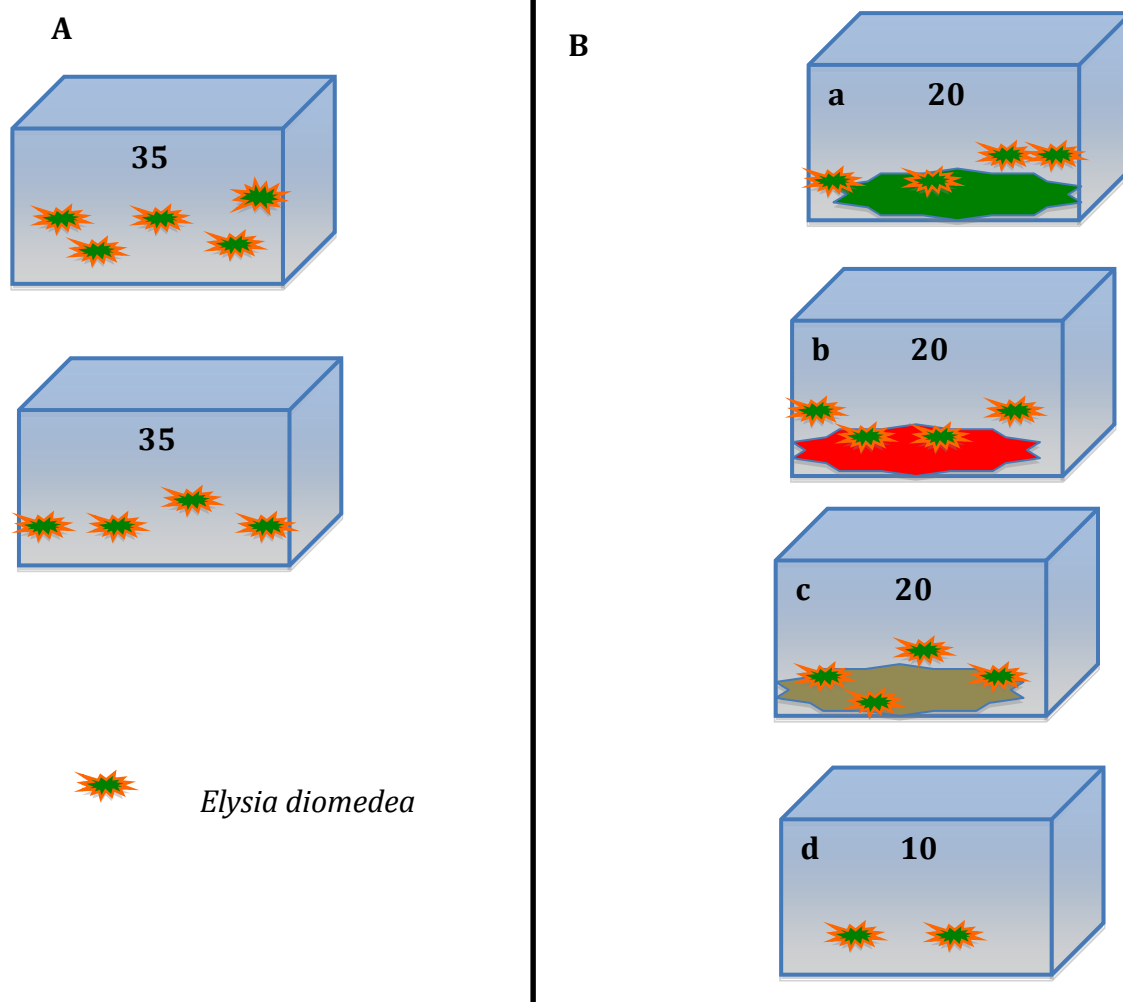


Figura 11. Diseño experimental empleado para evaluar la supervivencia de *Elysia diomedea* bajo distintos tipos de dieta. A. Al inicio del experimento se colocaron 70 individuos en dos acuarios y fueron mantenidos durante 40 días sin alimento. B. En la segunda fase del experimento se distribuyeron los individuos en cuatro acuarios distintos a) 20 individuos con alga verde *Codium fragile*, b) 20 individuos con alga parda *Padina sp.*, c) 20 individuos con alga roja *Pterocladia sp.* y d) 10 individuos sin dotación de algas.

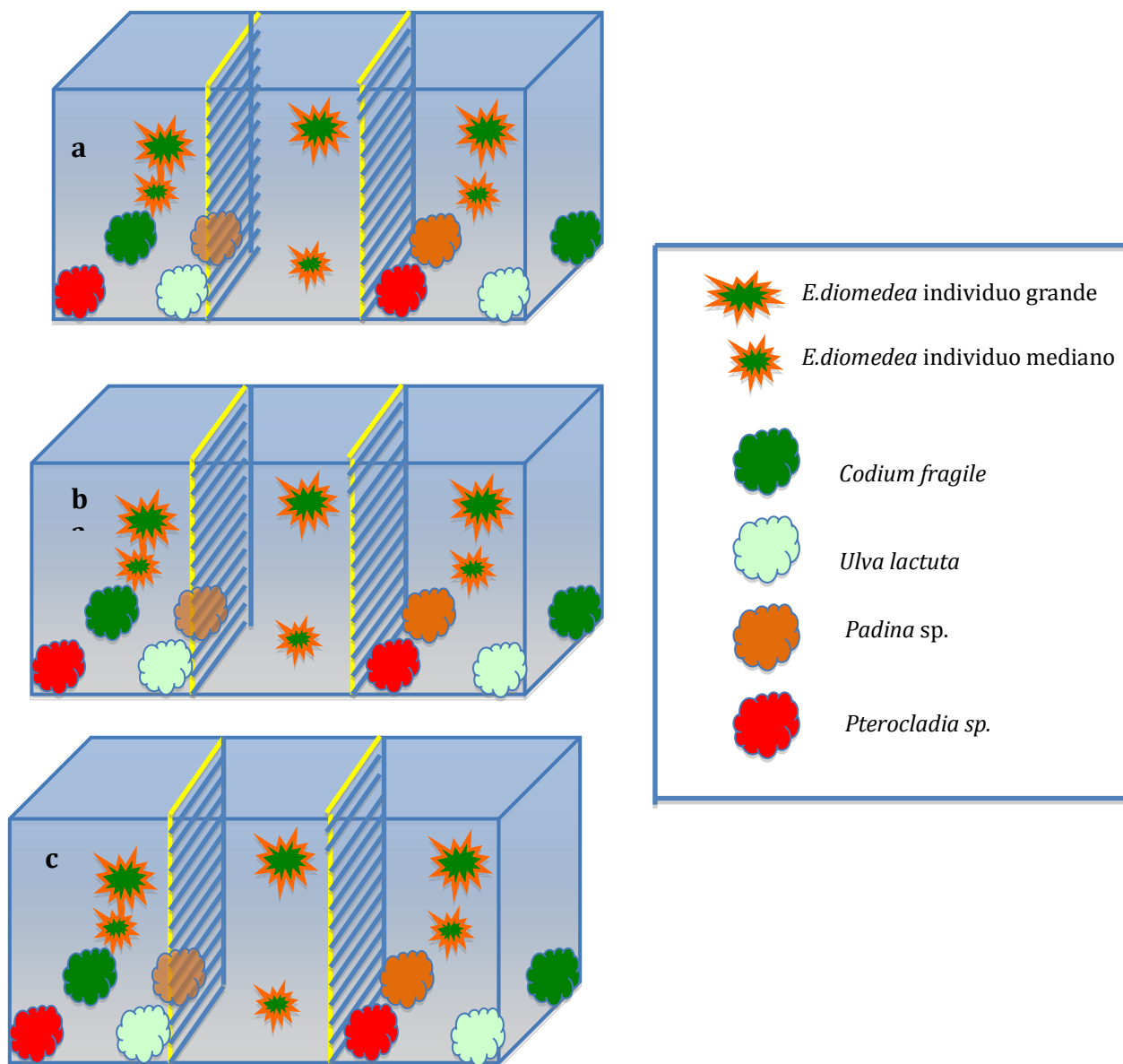


Figura 12. Diseño experimental para el ensayo de preferencia alimenticia en *Elysia diomedea*. Se emplearon tres acuarios conteniendo seis individuos cada uno. Cada acuario se dividió en tres secciones por medio de una malla firme que permitía el paso del agua, mas no de los animales. Las secciones centrales de cada acuario contenían dos individuos, diferenciados por su tamaño en grande (~8cm) y mediano(~6cm), en inanición. En cada una de las dos secciones restantes de los acuarios, se colocaron cuatro especies de algas distintas (*Codium fragile*, *Ulva lactuta*, *Padina sp.*, *Pterocladia sp.*), para ser probadas con dos individuos, también distinguidos por su tamaño (grande y mediano).

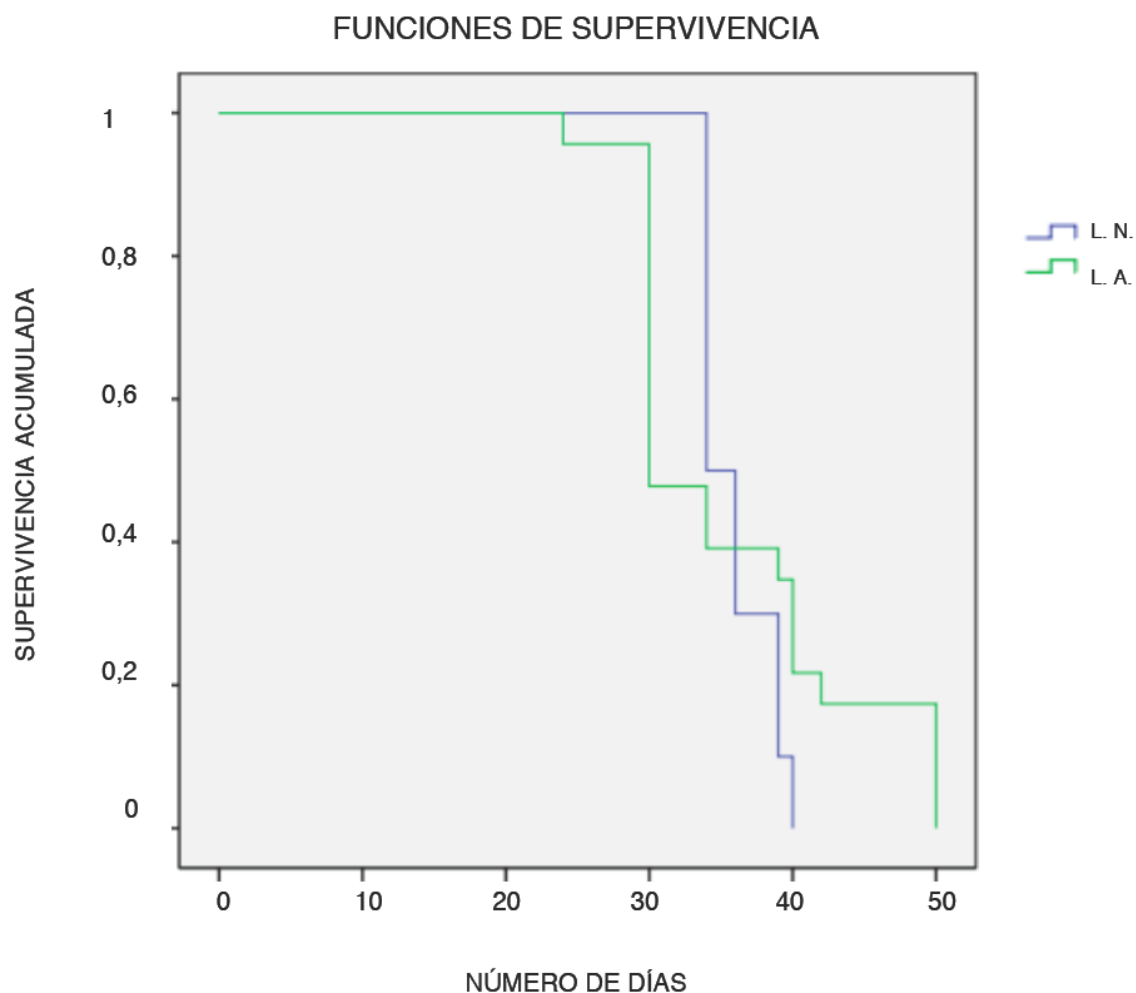


Figura 13. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier estimada para los individuos de *Elysia diomedea* sometidos a experimentación con distintos tratamientos de luz. (L. N.) Luz natural, (L. A.) Luz artificial. La supervivencia acumulada expresa la proporción de individuos para los que no ha tenido lugar el evento de muerte en el tiempo (días).

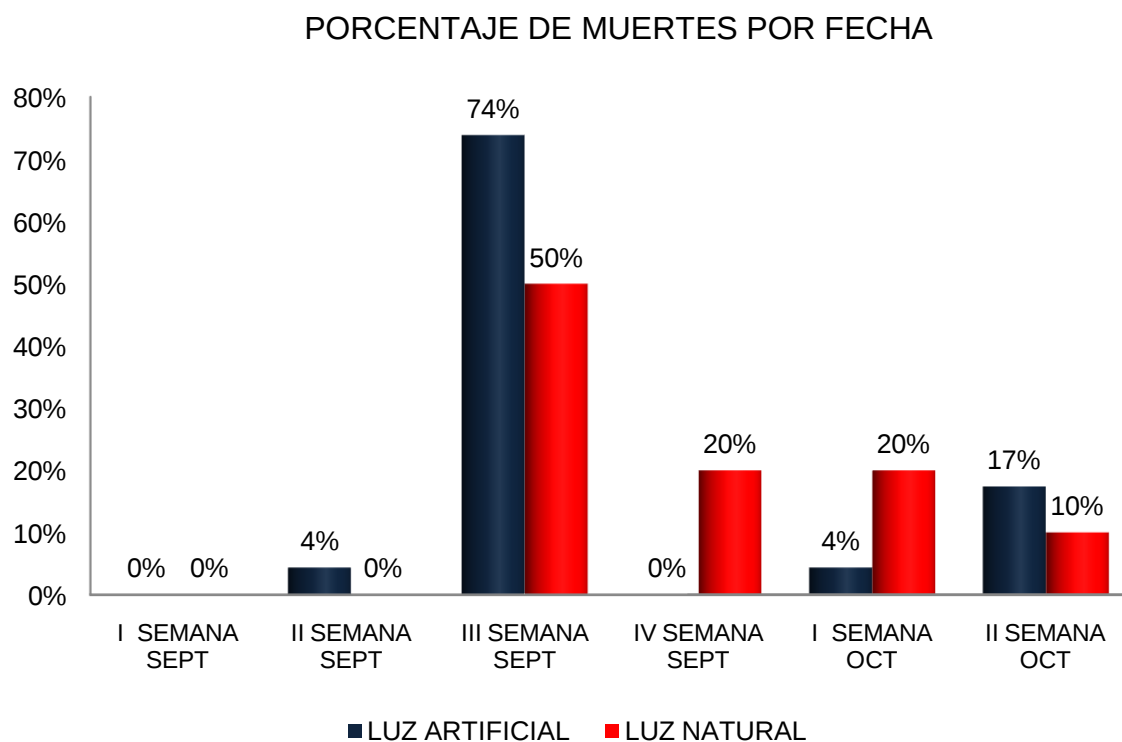


Figura 14. Porcentaje de muertes registradas durante el experimento de supervivencia de *Elysia diomedea* frente a distintos tipos de luz. Sept=Septiembre, Oct=Octubre.

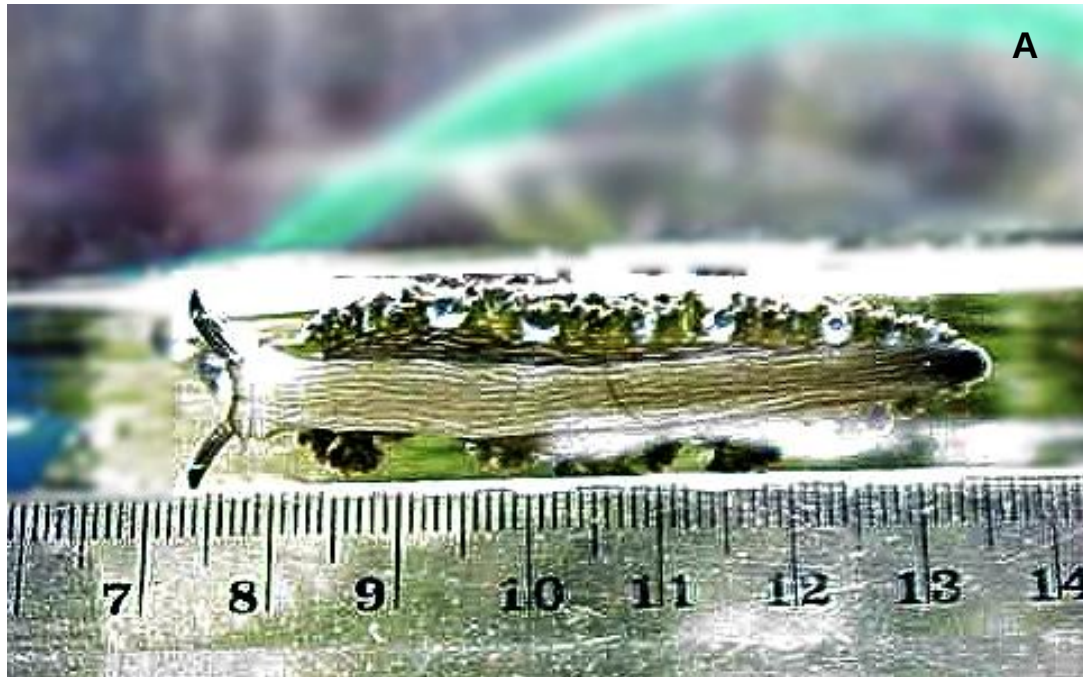


Figura 15. Variaciones de tamaño observadas durante experimentos con *Elysia diomedea* expuesta a luz artificial y provista de algas. A. Tamaño original de los individuos recién colectados (~7cm). B. Reducción de tamaño de un individuo (~4cm) luego de ser sometido a experimentación en cautiverio. El color y textura del individuo se mantienen en buen estado mientras su tamaño se reduce.

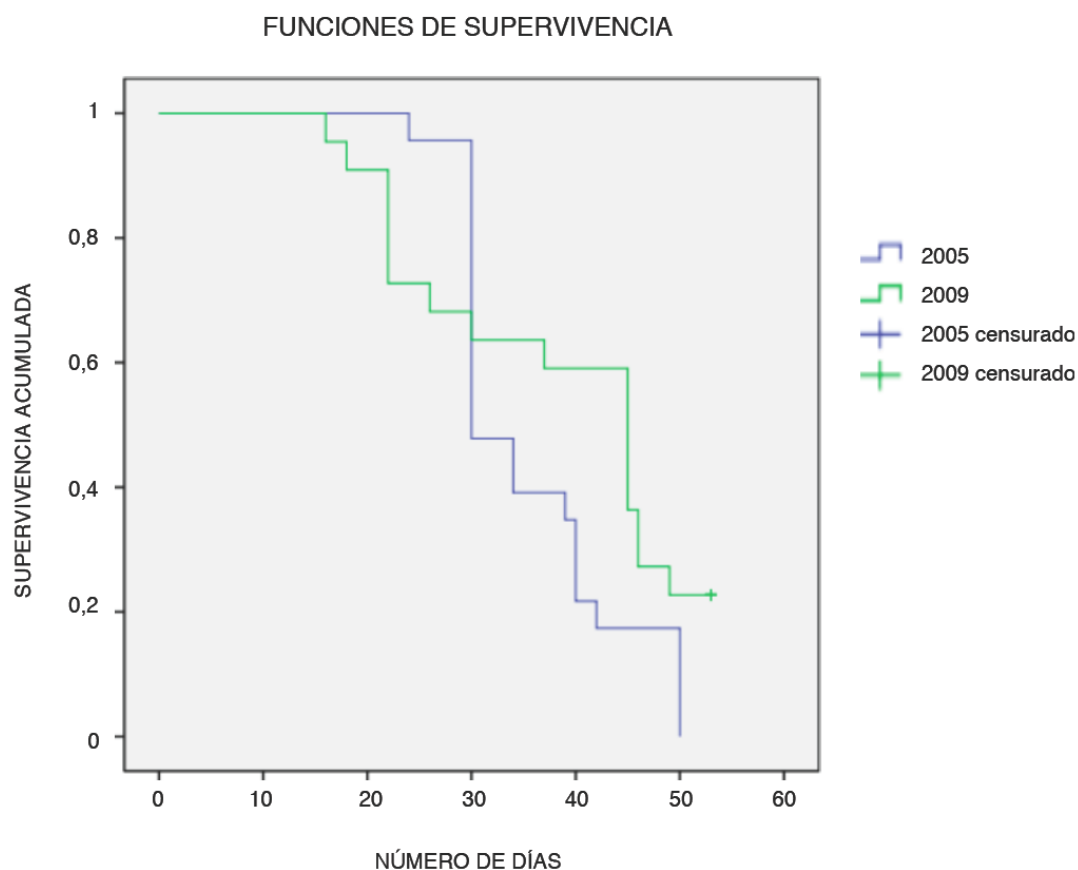


Figura 16. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier estimada para los individuos de *Elysia diomedea* sometidos a experimentación con luz artificial en los años 2009 y 2005. Año 2009: localidad de Salinas. Año 2005: localidad de Tongorachi. La cruz (+) representa el evento en el tiempo en el que los datos fueron censurados. (2005) Datos registrados durante el experimento del año 2005. (2009) Datos registrados durante el experimento realizado en el año 2009.

PORCENTAJE DE MUERTES REGISTRADAS POR AÑO

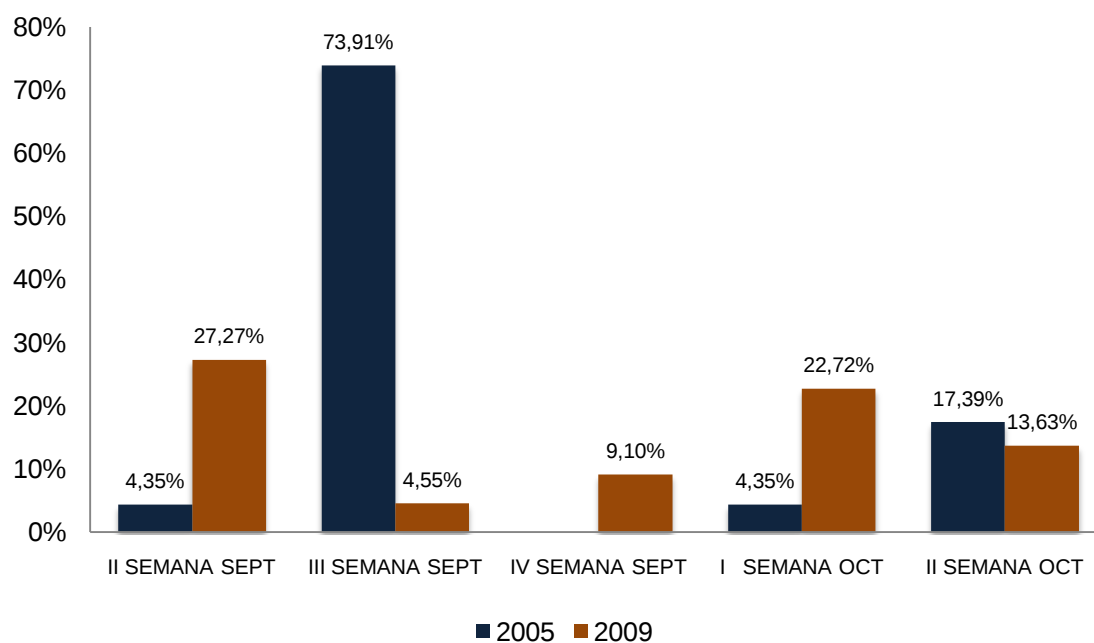


Figura 17. Porcentaje de muertes registradas durante los experimentos de supervivencia de *Elysia diomedea* en condiciones de luz artificial, efectuados en los años 2005 y 2009. Sept: Septiembre, Oct: Octubre.

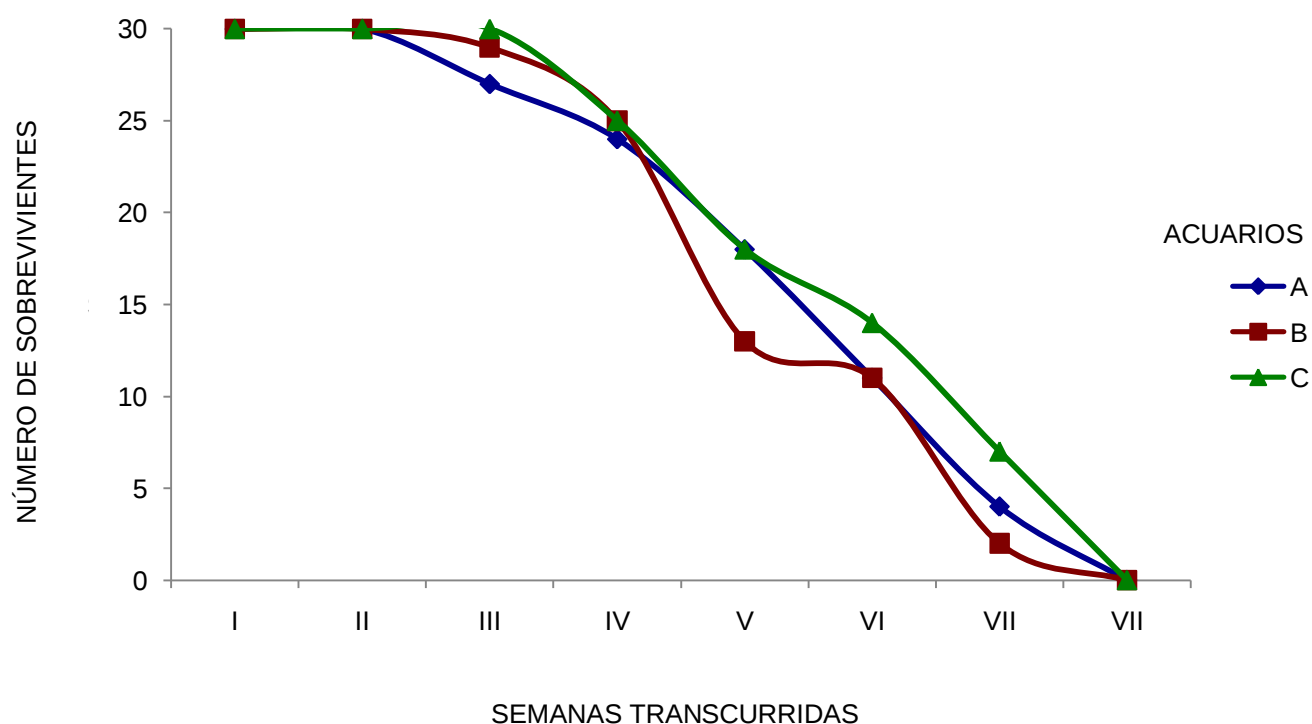


Figura 18. Diagrama de supervivencia de individuos de *Elysia diomedea* bajo condiciones de inanición. Para el experimento se emplearon tres acuarios (A, B y C). Eje X: Número de semanas transcurridas durante el experimento. Eje Y: Número de individuos sobrevivientes.



Figura 19. *Elysia diomedea* luego de haber sido sometida varias semanas a condiciones de inanición. Luego de que la babosa ha estado privada de una fuente de alimento, se hace evidente su pérdida de pigmentación y posterior reducción de tamaño (1,5 cm) entre la cuarta y sexta semana de experimentación.

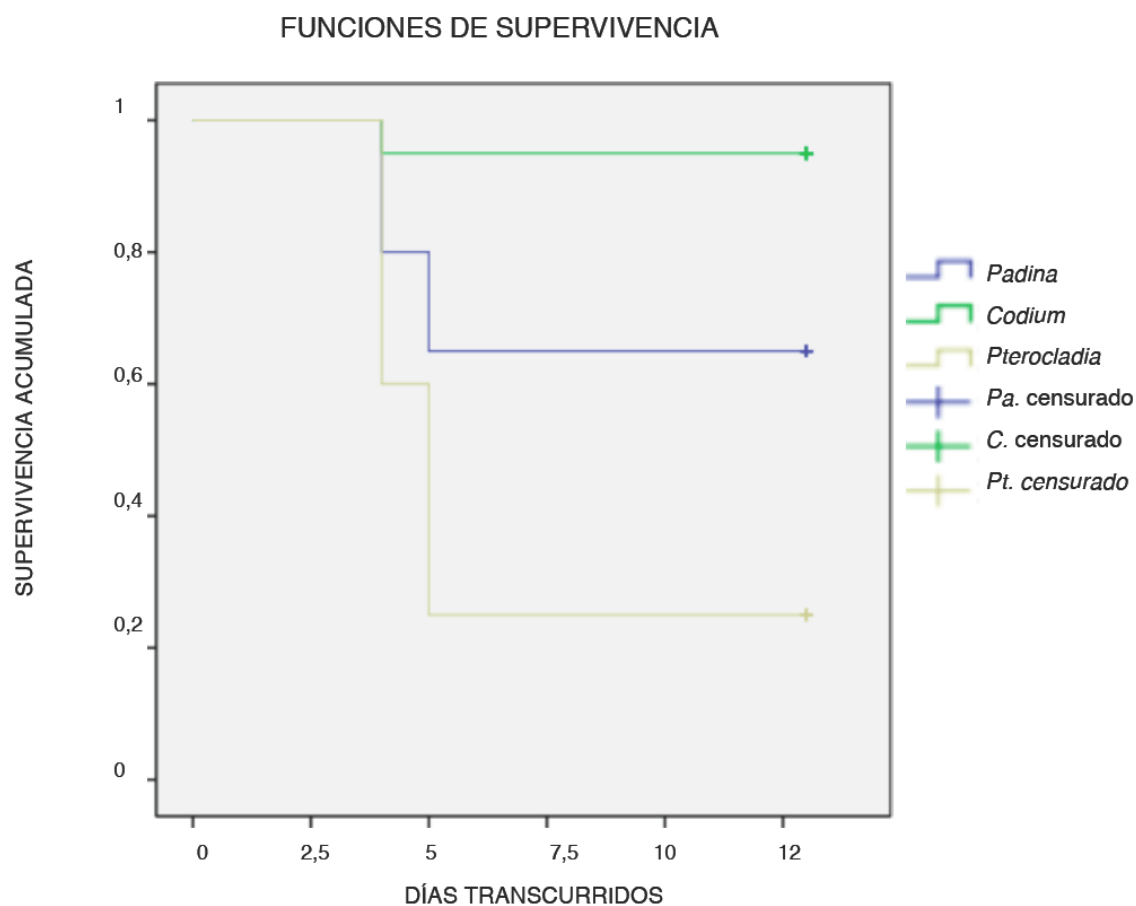


Figura 20. Curva de supervivencia de Kaplan Meier estimada para los individuos de *Elysia diomedea* alimentada con tres especies distintas de algas. Las cruces (+) representan los datos censurados para cada especie de alga probada. 1. *Padina* sp. (Pa.), 2. *Codium fragile* (C.), 3. *Pterocladia* sp. (Pt.).

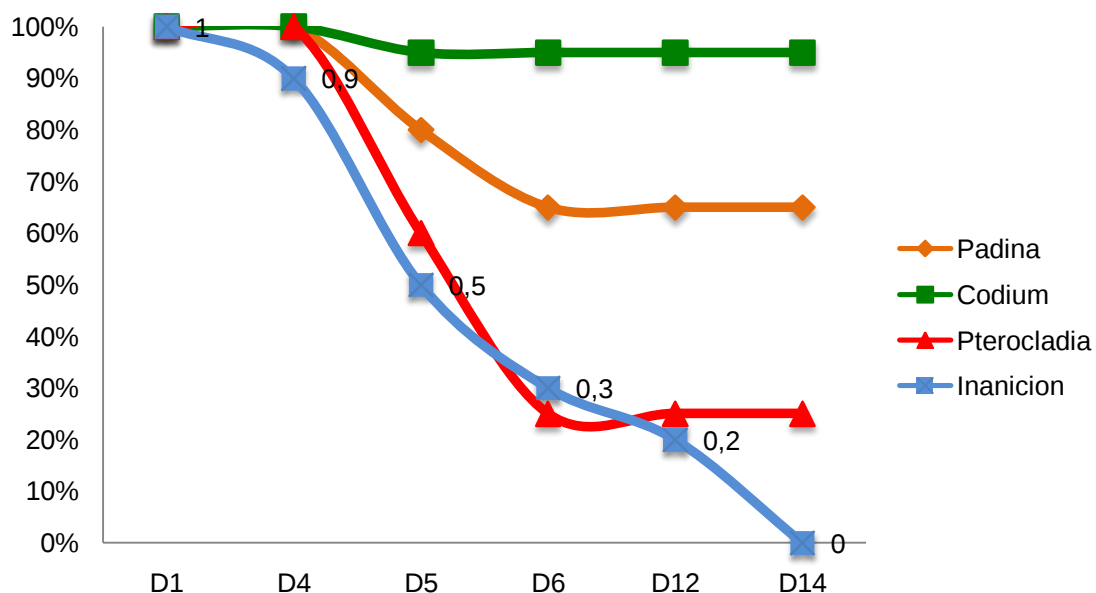


Figura 21. Diagrama comparativo del porcentaje de supervivencia de *Elysia diomedea* sometida a dieta con distintas especies de algas posterior al periodo de inanición general (40 días). Durante 40 días todos los individuos (70) fueron mantenidos en un acuario desprovistos de una fuente de alimento. Posteriormente, fueron separados en cuatro acuarios distintos, 20 individuos en un acuario con *Padina sp.*, 20 individuos con *Codium sp.*, 20 individuos con *Pterocladia sp.* y 10 individuos continuaron en inanición. Se probó el efecto de la dieta sobre la supervivencia de los individuos.

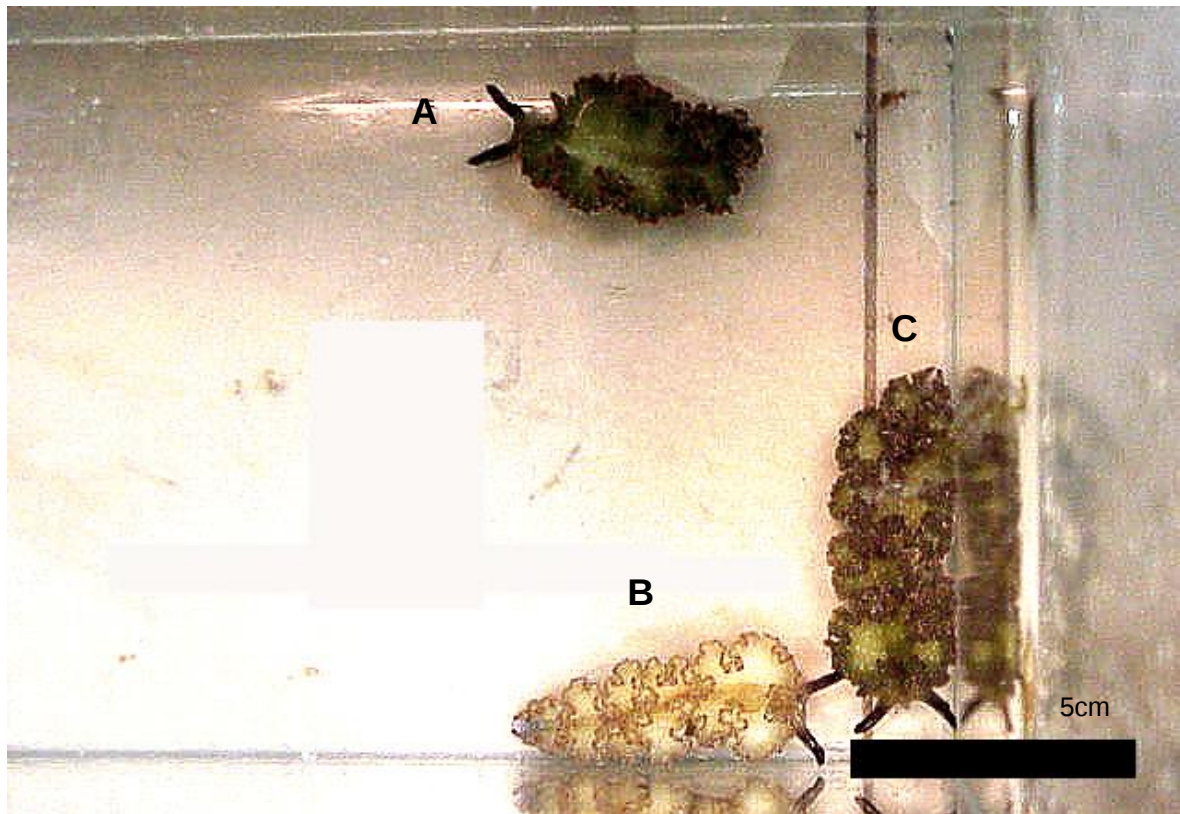


Figura 22. Recuperación progresiva de la pigmentación de *Elysia diomedea*.

A. Condiciones normales de pigmentación de una babosa al momento de la colecta. B. Babosa mantenida un mes en inanición. C. Babosa alimentada con algas dos semanas después del periodo de inanición.

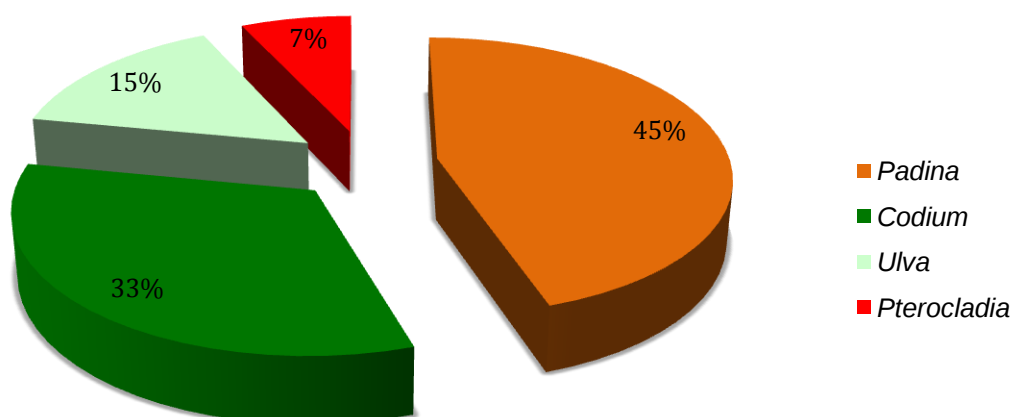


Figura 23. Porcentajes de tiempo de permanencia del total de individuos de *Elysia diomedea* sobre las cuatro especies de algas probadas durante el experimento de preferencia alimenticia. La figura describe el porcentaje de tiempo, medido en minutos, que permanecieron los individuos sobre las distintas especies de algas durante el experimento.

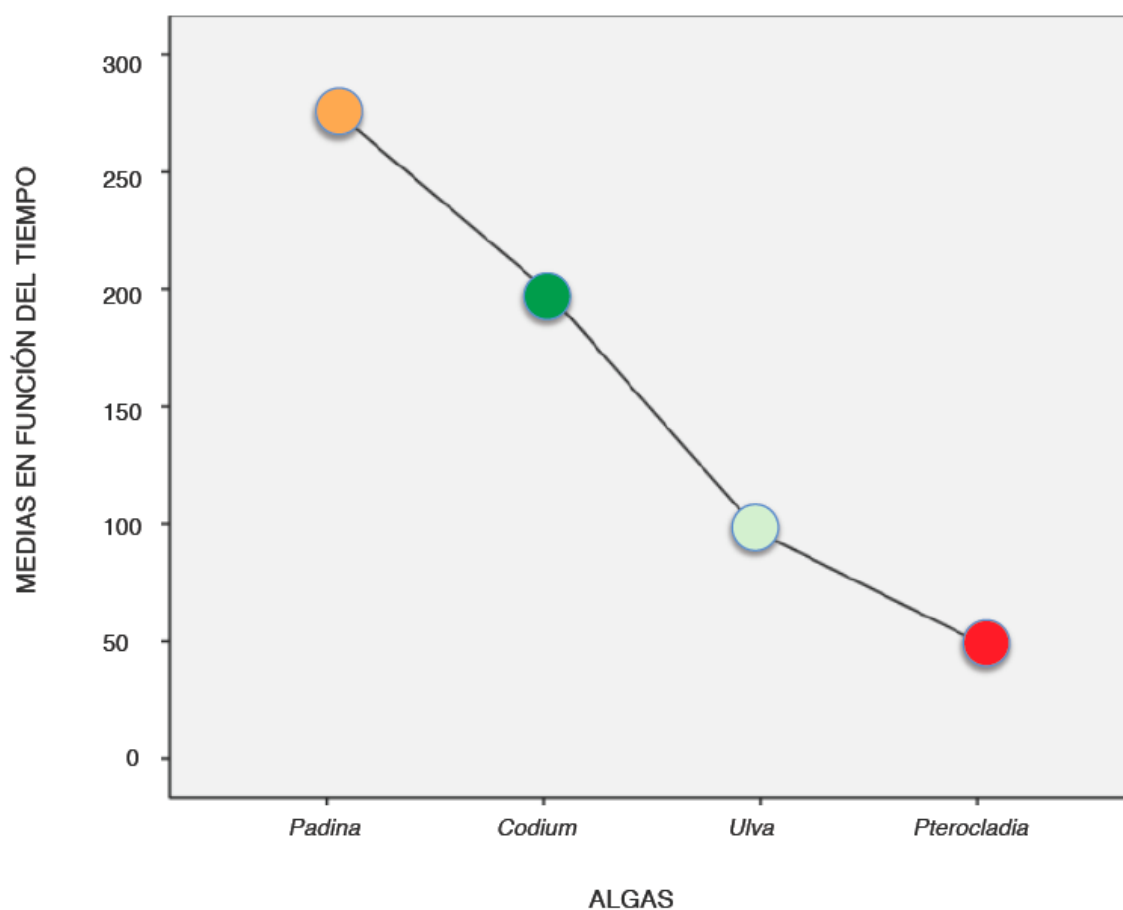


Figura 24. Medias estadísticas calculadas para el tiempo de permanencia de *Elysia diomedea* sobre cuatro especies de algas. *Padina* sp. (279,00), *Codium fragile*: (201,00), *Ulva lactuta* (96,00), *Pterocladia* sp (49,75).

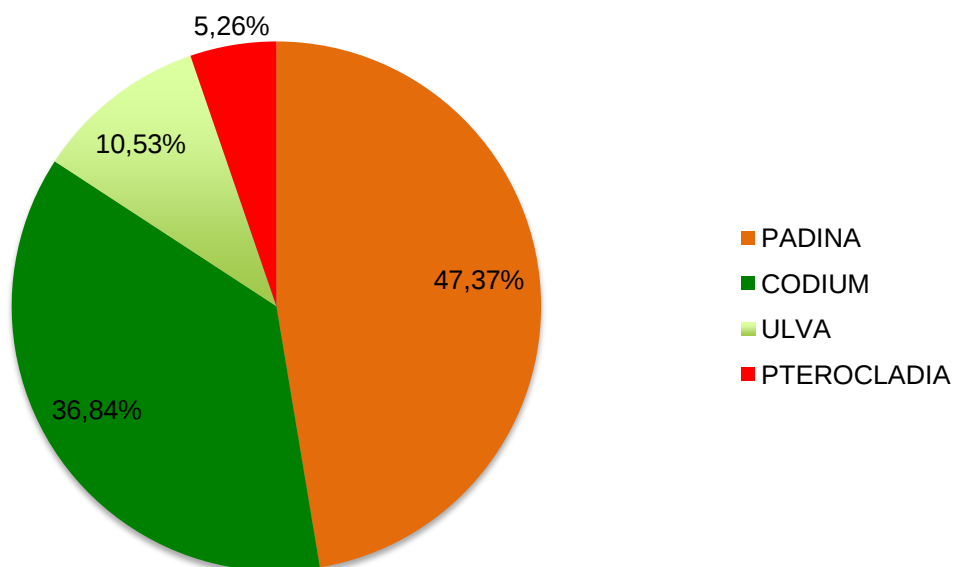


Figura 25. Porcentaje total de puestas de *Elysia diomedea* observadas sobre las especies de algas probadas. La figura representa el porcentaje de puestas encontradas sobre las distintas especies de algas durante todos los meses registrados en la investigación.

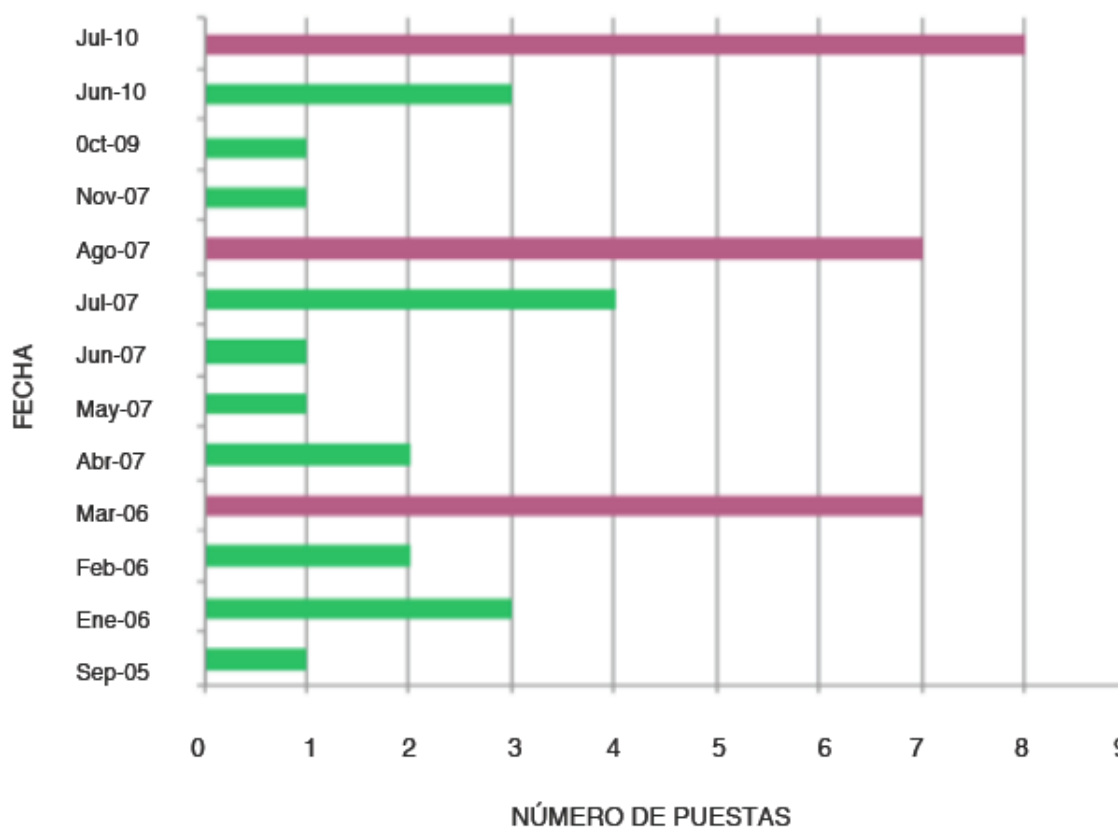


Figura 26. Número de puestas de *Elysia diomedea* colocadas por mes durante los años de investigación en cautiverio. Las columnas de color morado representan los tres meses donde se registró un mayor número de puestas.

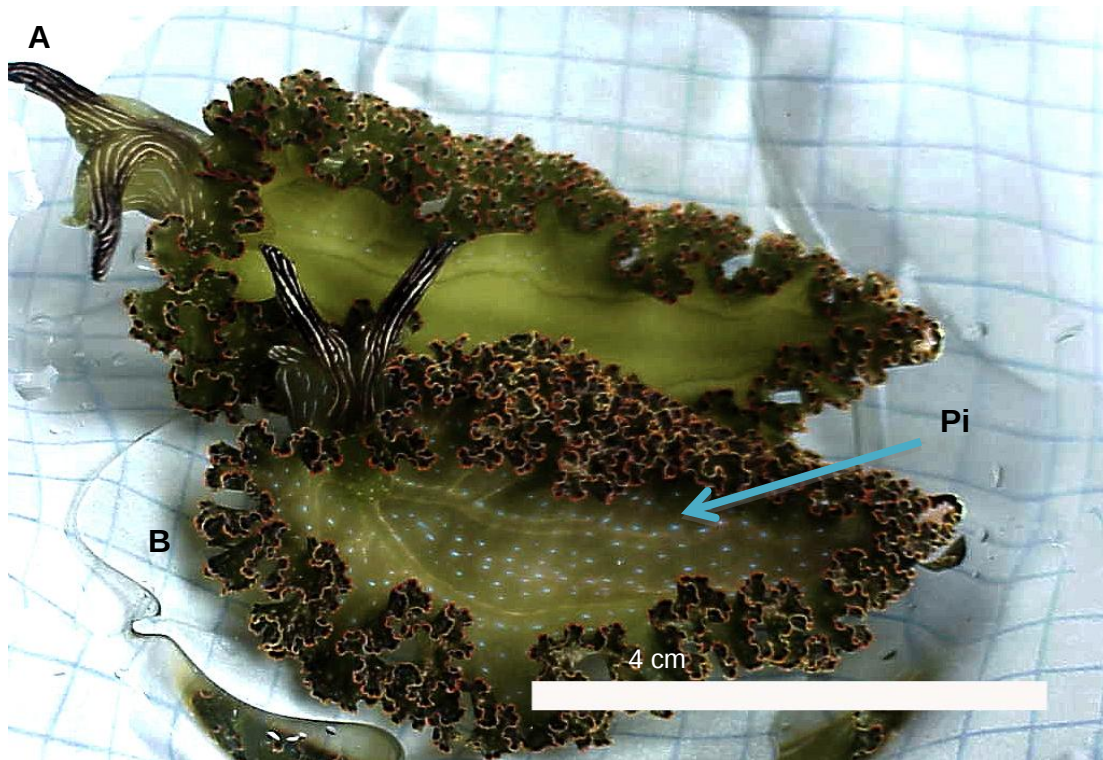


Figura 27. Pérdida progresiva de pigmentos iridiscentes turquesa durante experimentos con *Elysia diomedea* en inanición. A. Babosa en condiciones de inanición ha perdido casi por completo los pigmentos iridiscentes, B. Babosa alimentada con algas, presenta pigmentos iridiscentes, Pi. Pigmentos iridiscentes.

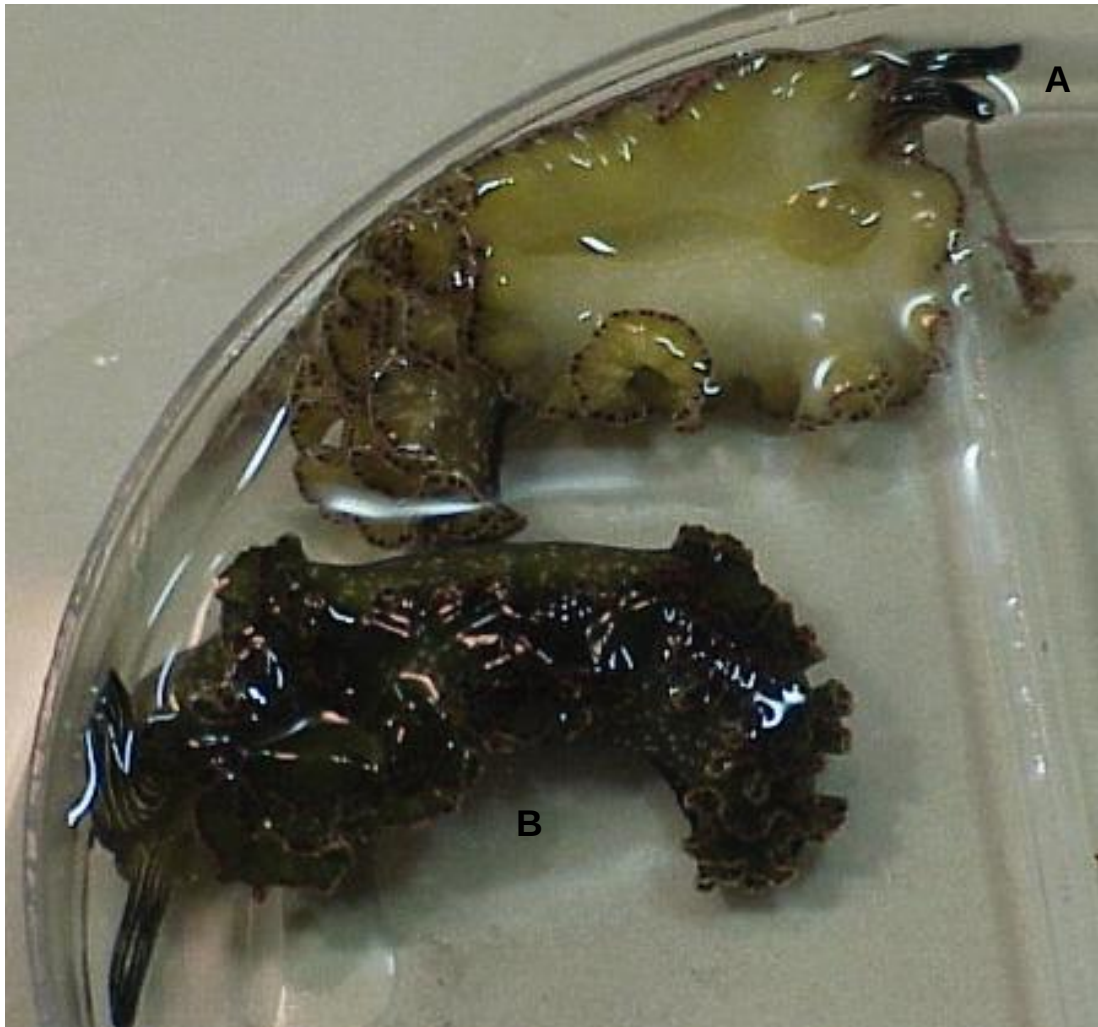


Figura 28. Pérdida de pigmentación durante experimentos con *Elysia diomedea* en condiciones de inanición. A. Babosa mantenida en privación de alimento. B. Babosa alimentada con algas.

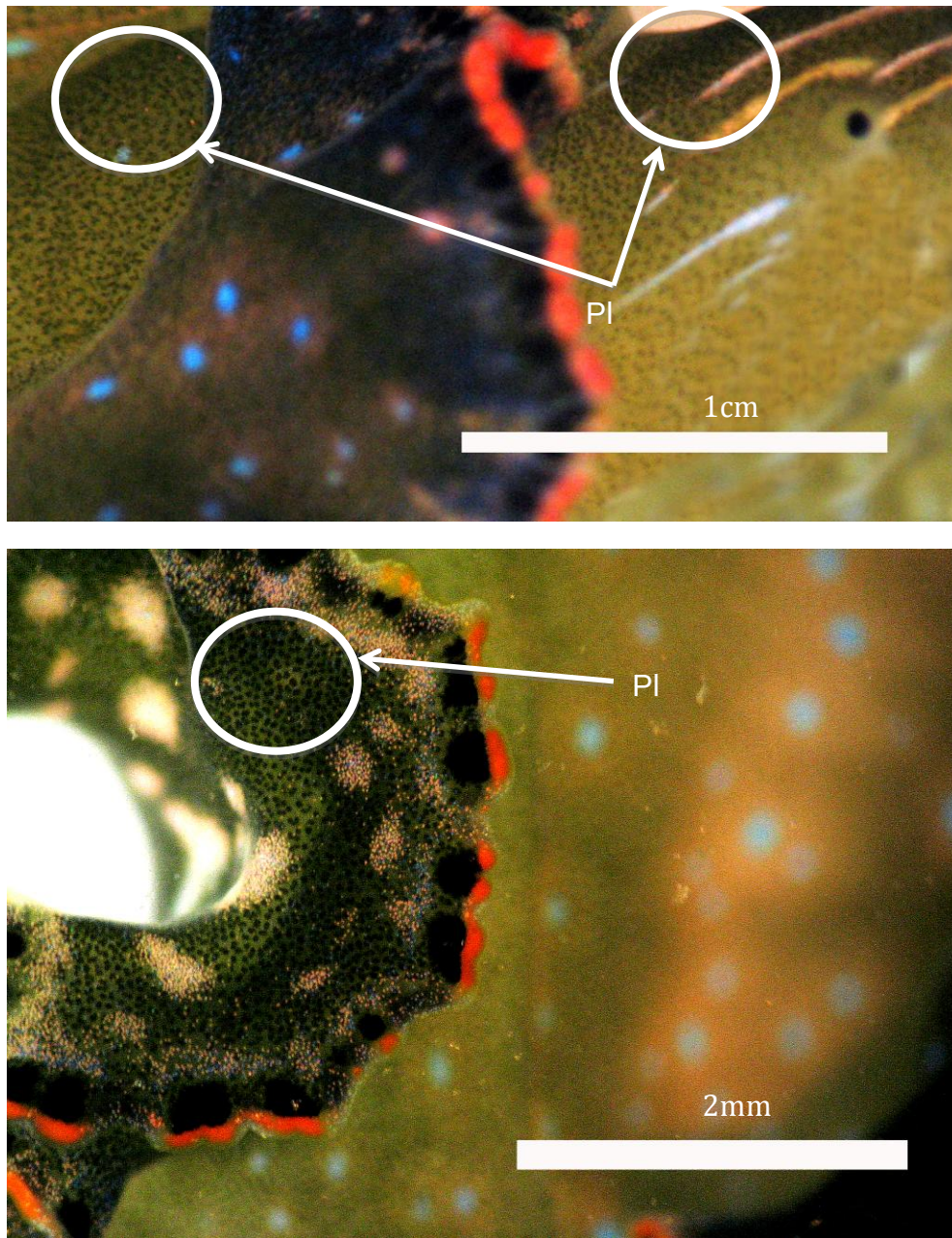


Figura 29. Identificación y ubicación de los puntos ciegos donde se divisan los plastos que están distribuidos por toda la estructura corporal de *Elysia diomedea*.

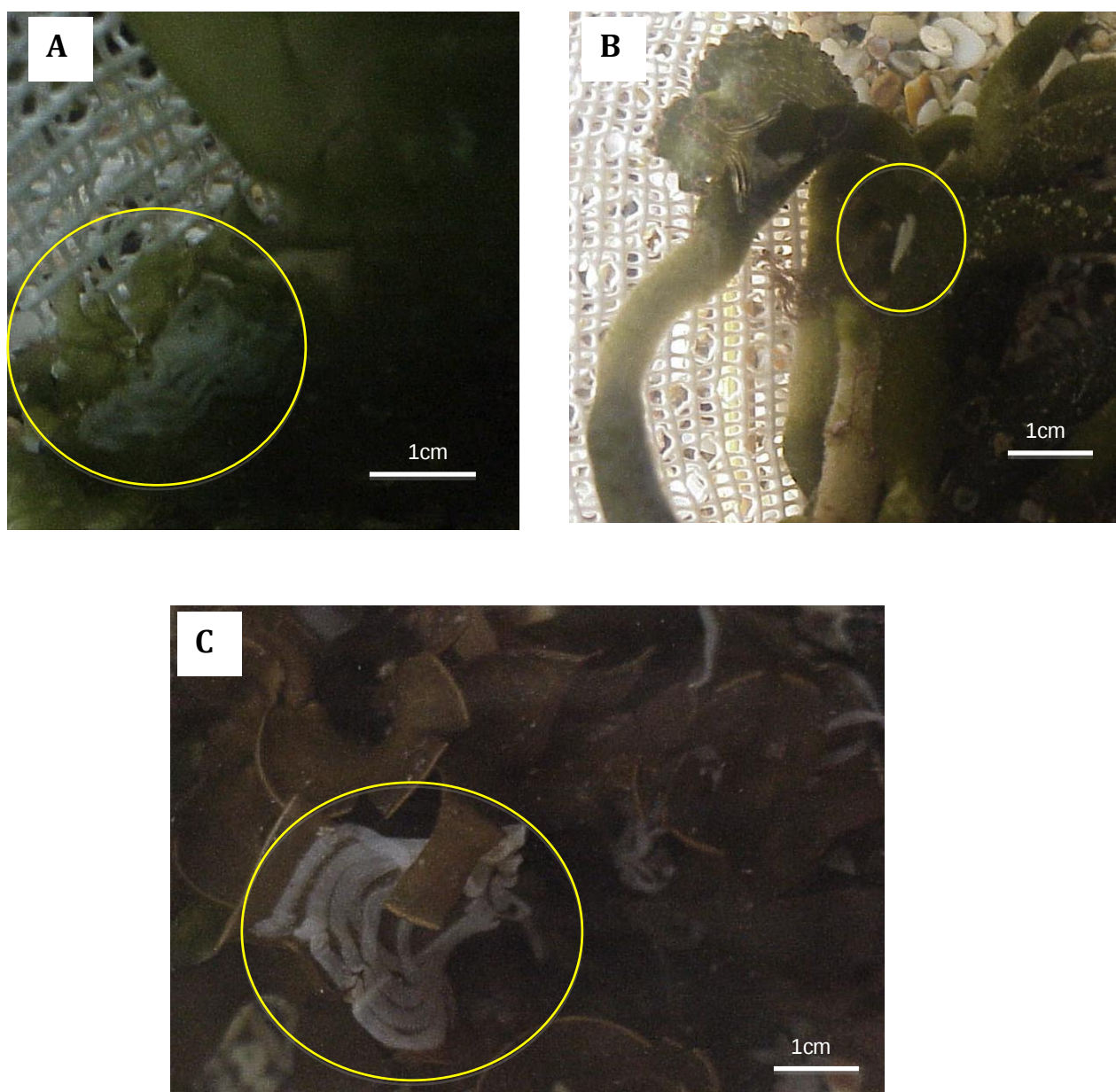


Figura 30. Huevos de *Elysia diomedea* colocados sobre algas. Las estructuras espirales blanquecinas dentro de la circunferencia amarilla, representan las puestas (ovoposiciones). A. Sobre *Ulva lactuca*, B. Sobre *Codium fragile*, C. Sobre *Padina* sp.

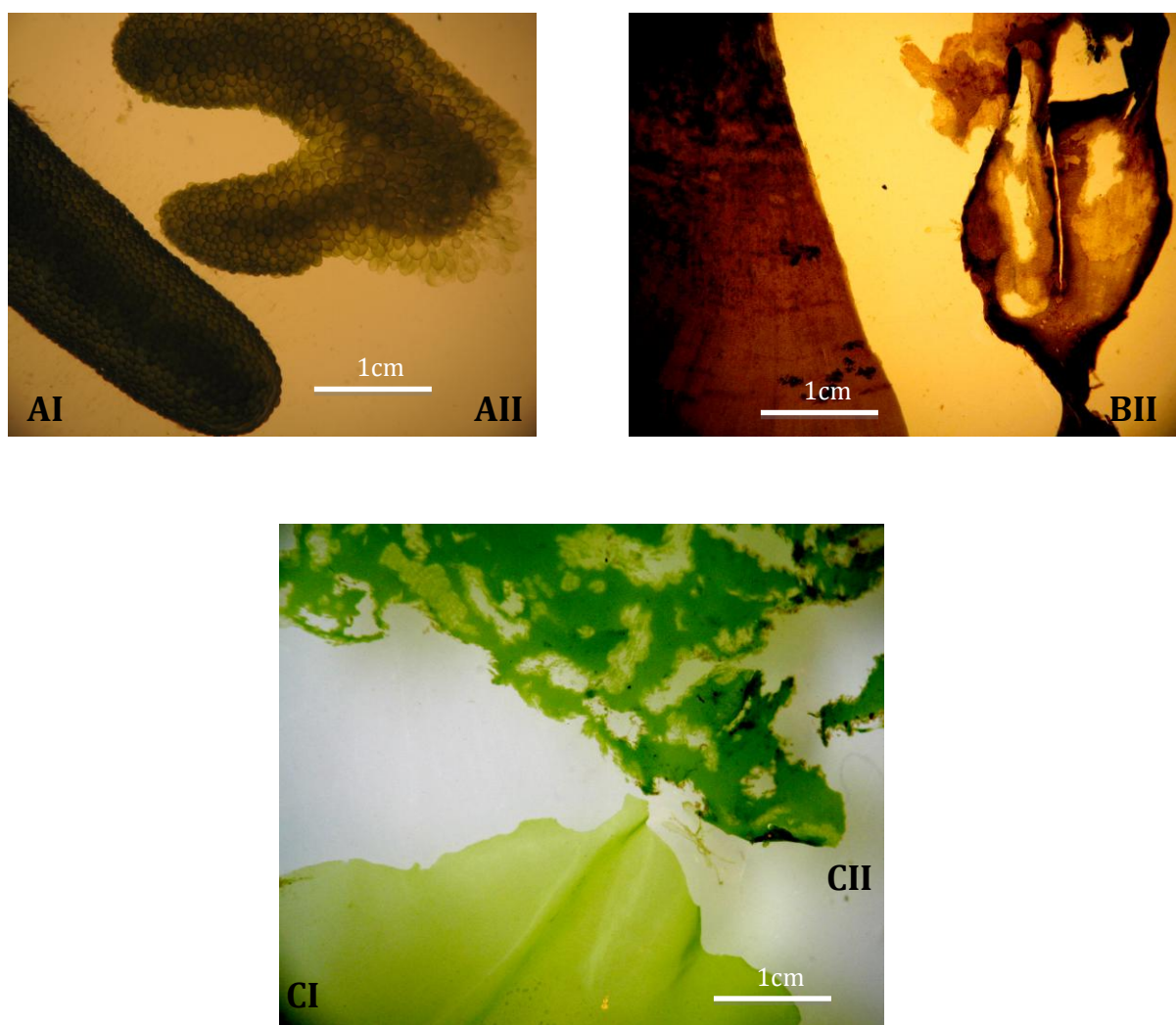


Figura 31. Evidencias de forrajeo de algas por parte de *Elysia diomedea*. A. *Codium fragile*, B. *Padina* sp., C. *Ulva* sp. I: No consumida, II: Consumida

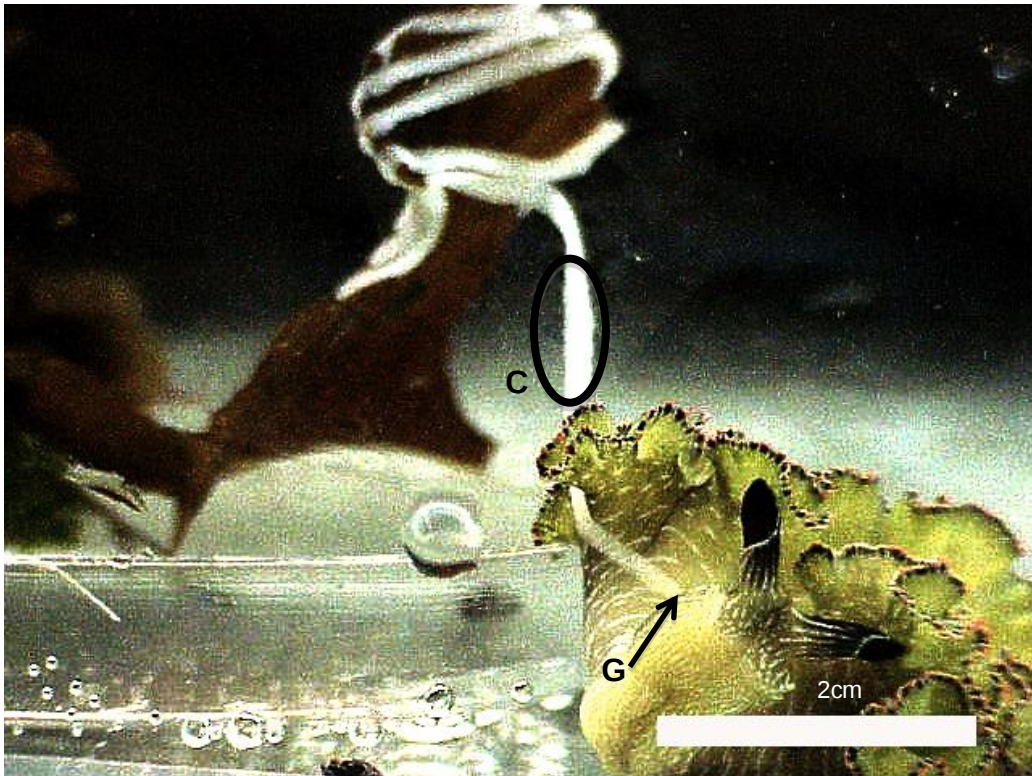


Figura 32. Proceso de puesta de huevos de *Elysia diomedea*. G. Gonoporo. C. Cápsulas empaquetadas conteniendo embriones.

10. TABLAS

Tabla 1. Individuos de *Elysia diomedea* empleados en el experimento de supervivencia bajo distintas condiciones de luz.

Tipo de luz	Acuario	No. Individuos	Localidad
Natural	A	5	Tongorachi
	B	5	Tongorachi
Artificial	A	5	Tongorachi
	B	18	Tongorachi
	C	3	Salinas

Las letras representan los acuarios empleados para cada tratamiento, es decir dos acuarios (A y B) para luz natural y tres acuarios (A, B y C) para luz artificial.

Tabla 2. Muertes registradas por fecha de los individuos de *Elysia diomedea* expuestos a luz natural y artificial (Continuación...).

No. INDIVIDUO	PROCEDENCIA	PECERA	FECHA DE COLECCIÓN	FECHA DE MUERTE	DIAS DE SUPERVIVENCIA
1	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	12/09/2005	24
2	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
3	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
4	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
5	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
6	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
7	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
8	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
9	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
10	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
11	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
12	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	30
13	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	22/09/20005	34
14	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	22/09/2005	34
15	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	7/10/2005	39
16	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	8/10/2005	40
17	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	8/10/2005	40
18	Tongorachi	A (L.A)	19/08/2005	10/10/2005	42
19	Tongorachi	B (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	50
20	Tongorachi	B (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	50
21	Tongorachi	B (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	50
22	Tongorachi	B (L.A)	19/08/2005	18/09/2005	50
23	Tongorachi	B (L.A)	19/08/2005	8/10/2005	40

(Continúa)

Tabla 2. Muertes registradas por fecha de los individuos de *Elysia diomedea* expuestos a luz natural y artificial (Continuación...).

No. INDIVIDUO	PROCEDENCIA	PECERA	FECHA DE COLECCIÓN	FECHA DE MUERTE	DIAS DE SUPERVIVENCIA
24	Salinas	C (L.A)	16/03/2005	22/09/2005	186
25	Salinas	C (L.A)	16/03/2005	22/09/2005	186
26	Salinas	C (L.A)	16/03/2005	22/09/2005	186
27	Tongorachi	A (L.N)	19/08/2005	22/09/2005	34
28	Tongorachi	A (L.N)	19/08/2005	22/09/2005	34
29	Tongorachi	A (L.N)	19/08/2005	22/09/2005	34
30	Tongorachi	A (L.N)	19/08/2005	22/09/2005	34
31	Tongorachi	A (L.N)	19/08/2005	22/09/2005	34
32	Tongorachi	B (L.N)	19/08/2005	24/09/2005	36
33	Tongorachi	B (L.N)	19/08/2005	24/09/2005	36
34	Tongorachi	B (L.N)	19/08/2005	7/10/2005	39
35	Tongorachi	B (L.N)	19/08/2005	7/10/2005	39
36	Tongorachi	B (L.N)	19/08/2005	8/10/2005	40

(L.A) luz artificial, (L.N) luz natural. Se probaron tres acuarios en luz artificial (A, B y C) y dos acuarios en luz natural (A y B).

Tabla 3. Porcentajes de individuos muertos de *Elysia diomedea* por fecha, según el tipo de luz al que fueron expuestos.

FECHA DE MUERTES	TOTAL MUERTES	PORCENTAJE DE INDIVIDUOS MUERTOS DE ACUERDO AL TIPO DE LUZ	
		L. A.	L. N.
PRIMERA SEMANA (09-2005)	0	0	0
SEGUNDA SEMANA (09-2005)	1 3,03%	1 4.35%	0
TERCERA SEMANA (09-2005)	22 66,67%	17 73.91%	5 50%
CUARTA SEMANA (09-2005)	2 6,06%	0	2 20%
PRIMERA SEMANA (10-2005)	3 9,09%	1 4.35%	2 20%
SEGUNDA SEMANA (10-2005)	5 15,15%	4 17.39%	1 10%
TOTAL	33	23 100% L.A.	10 100% L.N.

(L.A.) luz artificial, (L.N.) luz natural. El valor resaltado con rojo representa la temporada en la cual se registró el mayor número de muertes.

Tabla 4. Registros de muertes de individuos de *Elysia diomedea* durante el experimento de supervivencia en condiciones de luz artificial (12h luz/12h oscuridad), año 2009.

FECHA	DÍAS	NUMERO DE MUERTES REGISTRADAS POR DÍA
23/08/2009	0	0
08/09/2009	16	1
10/09/2009	18	1
14/09/2009	22	4
18/09/2009	26	1
22/09/2009	30	1
29/09/2009	37	1
07/10/2009	45	5
08/10/2009	46	2
11/10/2009	49	1
15/10/2009	53	
Se observa que el tamaño se ha reducido pero el color y textura siguen en buen estado		
DATOS CENSURADOS		
TIEMPO DE OBSERVACIÓN TOTAL: 53 días		

Tabla 5. Porcentajes de muertes de *Elysia diomedea* registradas durante el experimento de luz artificial realizado durante el año 2009.

Numero y porcentaje de muertes por semana	
FECHA	ACUARIO CON LUZ ARTIFICIAL
Día 1	0
PRIMERA SEMANA	0
SEGUNDA SEMANA	(27,27%)
TERCERA SEMANA	(4,55%)
CUARTA SEMANA	(9,1%)
PRIMERA SEMANA	(22,72%)
SEGUNDA SEMANA	(13,63%)
TOTAL	(77,27%)
DATOS CENSURADOS	

Tabla 6. Sobrevivientes de *Elysia diomedea* en condiciones de inanición.

SEMANA	A (Agua natural filtrada sin algas)	B (Agua natural filtrada sin algas)	C (Agua natural filtrada sin algas)
Primera semana	30	30	30
Segunda semana	30	30	30
Tercera semana	27	29	30
Cuarta semana	24	25	25
Quinta semana	18	13	18
Sexta semana	11	11	14
Séptima semana	4	2	7
Octava semana	0	0	0

A, B y C representan los tres acuarios empleados con 30 individuos cada uno.

Tabla 7. Muertes registradas por fecha durante el experimento de supervivencia de individuos de *Elysia diomedea* bajo distintos tipos de dieta.

NÚMERO DE SOBREVIVIENTES				
FECHA	A	B	C	INANICION
21/06/2007				70
31/07/2007	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	10 (100%)
03/08/2007	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	9 (90%)
04/08/2007	16 (80%)	19 (95%)	12 (60%)	5 (50%)
05/08/2007	13 (65%)	19 (95%)	5 (25%)	3 (30%)
11/08/2007	13 (65%)	19 (95%)	5 (25%)	2 (20%)
21/08/2007	13 (65%)	19 (95%)	5 (25%)	0 (0%)
DATOS CENSURADOS				

Después de 40 días los 70 individuos mantenidos en inanición fueron distribuidos en cuatro acuarios conteniendo: A. *Padina* sp., B. *Codium* sp., C. *Pterocladia* sp. y una pecera control en inanición.

Tabla 8. Minutos de permanencia de los individuos de *Elysia diomedea* sobre las cuatro especies de algas probadas simultáneamente durante el experimento de preferencia alimenticia.

MINUTOS DE PERMANENCIA									
ALGA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	TOTAL
PADINA	192	365	460	375	435	614	313	634	3388
CODIUM	383	468	415	290	284	241	200	131	2412
ULVA	307	160	180	92	120	19	141	133	1152
PTEROCLADIA	95	93	67	103	64	13	59	63	557
								PERMANENCIA TOTAL	7509

Tabla 9. Registros de actividad de Elysia diomedea de acuerdo al periodo del día.

DIA	ACUARIO	No. movimientos de cambio de sustrato/periodo del día		
		I	II	III
1	A	8	7	4
	B	5	13	4
	C	4	6	4
2	A	5	4	4
	B	7	5	4
	C	5	4	4
3	A	5	5	4
	B	8	6	5
	C	4	6	6
4	A	9	4	4
	B	10	6	4
	C	5	4	4
5	A	6	6	5
	B	5	7	4
	C	4	4	4
6	A	6	6	5
	B	9	5	4
	C	8	4	4
7	A	10	5	4
	B	14	7	4
	C	8	5	4
8	A	4	4	4
	B	14	9	4
	C	5	6	4
TOTAL		168	138	101

A, B y C: Acuarios empleados durante el experimento. I: 8h00-14h00. II: 14h00-19h00. III: 19h00-22h00. El valor escrito en rojo representa el periodo del día en el que se registró mayor actividad.

Tabla 10. Registro de fechas y ubicación de puestas de *Elysia diomedea*.

No. PUESTA	FECHA DE PUESTA	DIÁMETRO PUESTA	UBICACIÓN PUESTA	FECHA ECLOSION
1	04/01/06	N.R.	Alga (<i>Padina</i> sp.)	10/01/06
2	19/01/06	3,5 cm	Alga (<i>Padina</i> sp.)	N.R.
3	26/01/06	2,8 cm	Alga (<i>Padina</i> sp.)	N.R.
4	12/02/06	N.R.	Pared de la pecera	N.R.
5	22/02/06	1,0 cm	Pared de la pecera	N.R.
6	02/03/06	2,0 cm	Alga (<i>Padina</i> sp.)	08/03/06
7	04/03/06	2,2 cm	Alga (<i>Padina</i> sp.)	09/03/06
8	11/03/06	1,8 cm	Alga (<i>Padina</i> sp.)	N.R.
9	15/03/06	1,4 cm	Pared de la pecera	N.R.
10	15/03/06	1,5 cm	Pared de la pecera	N.R.
11	19/03/06	2,3 cm	Pared de la pecera	N.R.
12	19/03/06	1,7 cm	Pared de la pecera	N.R.
13	06/09/05	5-8 mm	Alga (<i>Codium</i> sp.)	12/09/05
14	24/04/07	N.R.	Pared de la pecera	30/04/07
15	30/04/07	N.R.	Pared de la pecera	06/05/07
16	12/05/07	N.R.	Pared de la pecera	18/05/07
17	04/06/07	2 cm	Pared de la pecera	09/06/10
18	12/07/07	N.R.	Pared de la pecera	16/07/07
19	12/07/07	N.R.	Pared de la pecera	N.R.
20	14/07/10	N.R.	Pared de la pecera	N.R.
21	16/07/07	N.R.	Pared de la pecera	N.R.
22	19/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	25/08/10
23	19/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	25/08/10
24	19/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	24/08/10
25	19/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	25/08/10
26	20/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	26/08/10
27	20/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	26/08/10
28	20/08/07	N.R.	Alga (<i>Codium</i> sp.)	25/08/10
29	02/11/07	2 cm	En una de las rocas	08/11/07
30	07/10/09	2 cm	Pared de la pecera	11/10/09
31	17/06/10	3 cm	Pared de la pecera	N.R.
32	28/06/10	2 cm	Pared de la pecera	02/07/10
33	28/06/10	2,2 cm	Pared de la pecera	04/07/10
34	01/07/10	N.R.	Alga (<i>Ulva</i> sp.)	N.R.
35	02/07/10	N.R.	Alga (<i>Padina</i> sp.)	N.R.
36	02/07/10	N.R.	Alga (<i>Padina</i> sp.)	N.R.
37	03/07/10	N.R.	Alga (<i>Pterocladia</i> sp.)	N.R.
38	05/07/10	N.R.	Pared de la pecera	N.R.
39	06/07/10	N.R.	Alga (<i>Padina</i> sp.)	N.R.
40	06/07/10	N.R.	Pared de la pecera	N.R.
41	10/07/10	N.R.	Pared de la pecera	N.R.

N.R. No hay registro.

Tabla 11. Temporadas altas de avistamientos de crías y adultos de *Elysia diomedea* en campo.

LOCALIDAD	FECHA DIVISADA	FECHA MUERTE	No. INDIVIDUOS	OBSERVACIONES
Tongorachi	26-27/07/2005	liberadas	1 cm, 2 cm	
Salinas	30/11/05	colectadas	Individuos grandes	
Salinas	01/02/06	colectadas	Individuos grandes (7-5 cm)	Reducida densidad de <i>Ulva</i> sp.
Salinas	01/04/07	liberadas	2 (2 cm y 3 cm)	El esfuerzo de muestreo fue muy grande y no se encontraron muchas babosas. Gran cantidad de <i>Ulva</i> sp.
Salinas	20/06/07	liberadas	Muchas babosas pequeñas (1-2 cm)	Proliferación de alga roja <i>Pterocladia</i> sp. También se encontraron individuos grandes.
Salinas	08/09/07			No se evidenció ningún tipo de alga predominante.
Salinas	22/10/07	colectadas	Colección durante el atardecer	Gran esfuerzo de muestreo.
Salinas	23/10/07	colectadas	Durante la mañana	Esfuerzo de muestreo significativamente menor que el día anterior.
Salinas	20/02/08	colectadas	Individuos grandes (8-6 cm)	Pocos Individuos gran esfuerzo de muestreo.
Salinas	30/11/08	colectadas	Individuos muy grandes	No se observa proliferación de un alga específica.
Salinas	15/08/09	colectadas	Individuos grandes abundantes y pequeños también	Poco esfuerzo de muestreo. Proliferación alga roja filamentosa <i>Pterocladia</i> sp. Individuos más cerca de la orilla de lo usual. Se encontraron muchos especímenes sobre el alga roja.
Salinas	23/08/09	colectadas	Individuos grandes abundantes	Más cerca de la orilla que lo usual. Proliferación de alga roja <i>Pterocladia</i> sp. Poco esfuerzo de muestreo.
Salinas	21/09/09	colectadas	individuos grandes (4- 8cm) Agua limpia	Proliferación de <i>Ulva</i> sp. Poco esfuerzo de muestreo. Agua limpia.
Salinas	8y11/06/2010	colectadas	Individuos juveniles abundantes	No se observaron muchos individuos adultos. Gran esfuerzo de muestreo. Semana anterior hubo 'aguaje'

Los valores resaltados representan las fechas en las que se diviso mayor abundancia de individuos juveniles.

11. ANEXOS

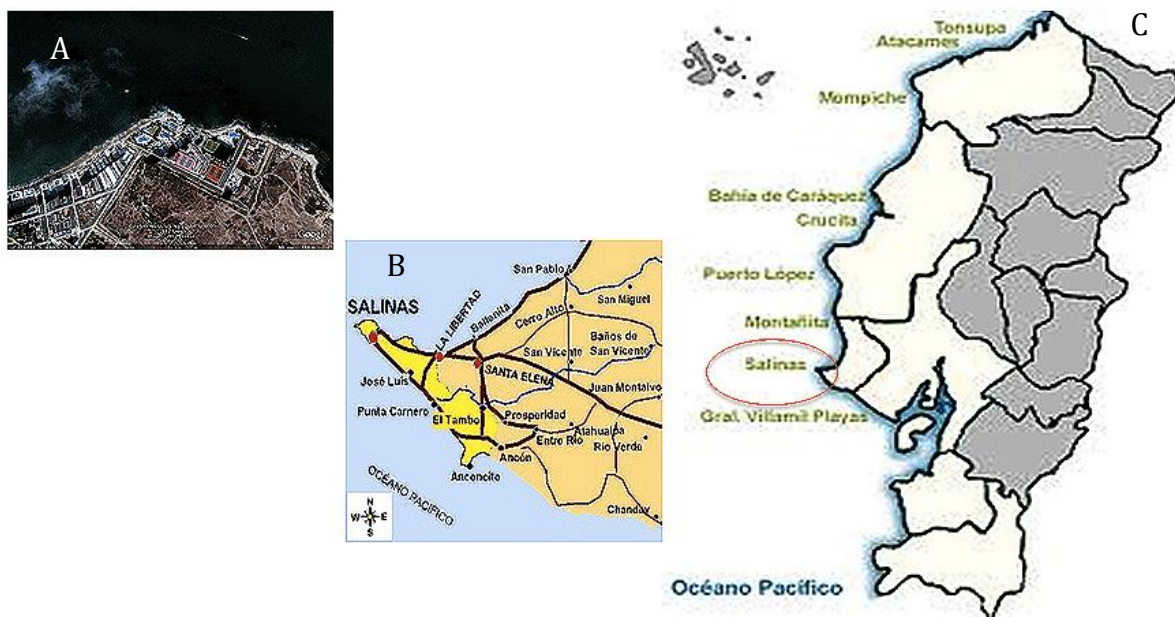
Anexo 1. Registros de distribución de *Elysia diomedea* en América.

PAÍS	LOCALIDAD
Estados Unidos	Golfo de California
República Dominicana	República Dominicana
México	Bahía de Banderas
	Mar de Cortez
	Chamela
Costa Rica	Costa Rica
El Salvador	Golfo de Fonseca
Panamá	Bahía de Panamá
Ecuador	Guayas
	Manabí
	Esmeraldas
Perú	Punta Sal
	Cancas
	Máncora
	Pocitas

Anexo 2. Mapa de distribución *Elysia diomedea*



Anexo 3. Mapa Área de estudio Salinas

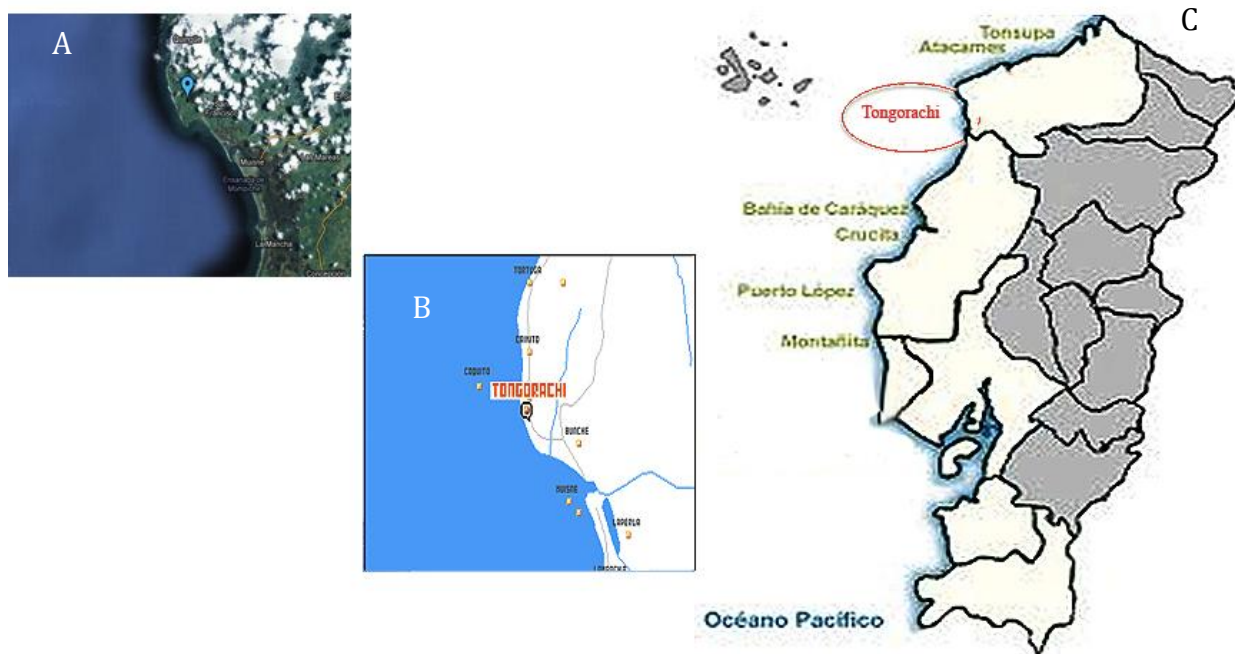


Localidad 1. A. Vista satelital del área de estudio, B. Ubicación del área de estudio dentro de la provincia, C. Ubicación del área de estudio en la costa ecuatoriana.

Anexo 4. Tabla de grupos animales más comunes observadas en Salinas.

PHYLUM	ANIMALES OBSERVADOS (NOMBRE COMÚN)
Cnidaria	Anémonas, pólipos
Mollusca (Clase Gasteropoda)	Caracoles marinos, babosas de mar, lapas
Anelida (Clase Polichaeta)	Gusanos marinos
Artropoda (Subphylum Crustacea)	Cangrejos, camarones, jaibas
Equinoderma (Clase Ofiuroidea)	Ofiuras
Equinoderma (Clase Equinoidea)	Erizos de mar
Equinoderma (Clase Holoturoidea)	Pepinos de mar

Anexo 5. Mapa Área de Estudio Tongorachi.

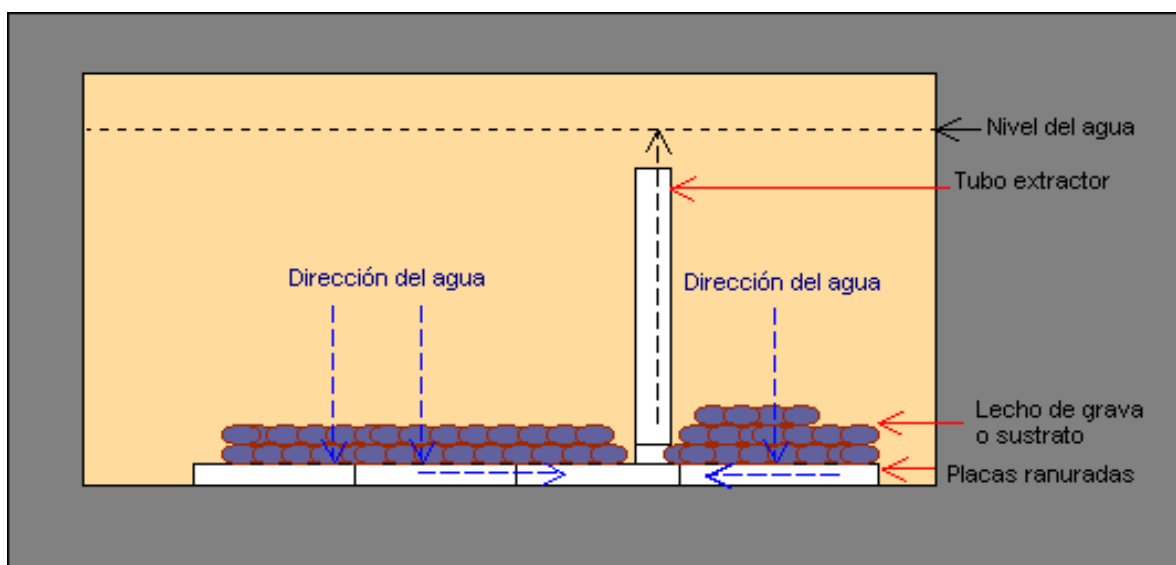


Localidad 2. A. Vista satelital del área de estudio, B. Ubicación del área de estudio dentro de la provincia, C. Ubicación del área de estudio en la costa ecuatoriana.

Anexo 6. Filtro Biológico. El sistema de filtrado consiste en que el aire producido por el aireador impulsa, por succión dentro del tubo, una corriente de agua ascendente. El tubo está firmemente sujeto a la placa y por lo tanto el agua que asciende es tomada desde debajo de la misma. Esa agua es repuesta por la que está dentro del acuario. Se produce así un circuito cerrado en el cual la misma agua pasa varias veces por día a través de la grava, por debajo de las placas y retorna por el tubo dentro del acuario (líneas azules en el gráfico).

Sobre las placas de filtración ubicadas en el fondo se coloca material calcáreo, como conchilla molida, de esta manera a medida que el agua circula entre el material, éste retiene las impurezas, que son básicamente los desechos orgánicos de los peces e invertebrados, retazos de algas muertas, entre otros.

Este tipo de filtro se considera biológico pues propicia el desarrollo de una colonia de bacterias aeróbicas que son fundamentales en el proceso de transformar los desechos orgánicos, de los que se alimentan, en nitratos que enriquecen el medio. El oxígeno es aportado permanentemente por el agua que circula a través del lecho (Petracini, 2010).



Anexo 7. Análisis estadístico de Kaplan Meier para estimar tiempo de supervivencia de *E. diomedea* bajo distintas condiciones de luz. A. Cálculo de medias. B. Cálculo de medianas. C. Prueba Log Rank. Experimento: 1. Luz natural, 2. Luz artificial.

A

Experimento	Media ^a			
	Estimado	Error Std.	95% Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
1	36,000	,775	34,482	37,518
2	35,783	1,678	32,495	39,071
Total	35,848	1,183	33,530	38,167

a. Estimación está limitada al mayor tiempo de supervivencia si los datos son censurados.

B

Experimento	Mediana	
	95% Intervalo de Confianza	
	Límite inferior	Límite superior
1,00	.	.
2,00	26,388	33,612
Total	30,820	37,180

C

	Ji - cuadrado	gl.	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,249	1	,618

Test de igualdad de distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de experimento

Anexo 8. Resultados del ANOVA para los datos de individuos de *Elysia diomedea* probados en luz artificial y luz natural. El valor señalado dentro de la circunferencia (0.659) denota el nivel de significación de los resultados.

ANOVA

DIAS

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre Grupos	116.583	2	58.292	.426	.659
Dentro de Grupos	2875.250	21	136.917		
Total	2991.833	23			

Anexo 9. Prueba Estadística de Mann-Whitney de supervivencia de individuos de *Elysia diomedea* expuestos a luz artificial y luz natural. El valor señalado dentro de la circunferencia (0,345) denota el nivel de significación de los resultados. Tipo de luz: 1. Luz natural, 2. Luz artificial.

Prueba de Mann-Whitney

RANGOS

TIPO DE LUZ	N	RANGO MEDIAS	SUMA DE RANGOS
1	10	19.35	193.50
2	23	15.98	367.50
Total	33		

PRUEBA ESTADÍSTICA

	DÍAS
Mann-Whitney U	91.500
Asymp. Sig. (2-tailed)	.345
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.363 ^a

a. No corregido para coincidencias.

b. Variable de grupo: tipo de luz

Anexo 10. Análisis estadístico de Kaplan Meier para estimar tiempo de supervivencia de *E. diomedea* bajo luz artificial en los años 2005 y 2009. A. Cálculo de medias. B. Cálculo de medianas. C. Prueba Log Rank. Experimento: 1. Año 2005, 2. Año 2009.

A

Experimento	Media ^a			
	Estimado	Error Std.	95% Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
1	35,783	1,678	32,495	39,071
2	38,455	2,777	33,012	43,897
Total	37,089	1,608	33,937	40,240

a. Estimación está limitada al mayor tiempo de supervivencia si existen censuras.

B

Experimento	Mediana	
	95% Intervalo de Confianza	
	Límite inferior	Límite superior
1	26,388	33,612
2	37,924	52,076
Total	27,611	46,389

C

	Ji-Cuadrado	gl.	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,534	1	,111

Test de igualdad de distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de Experimento.

Anexo 11. Resultados del ANOVA y prueba Post Hoc de Tukey para evaluar los datos de supervivencia de *Elysia diomedea* en condiciones de inanición.

A. ANOVA: El valor enmarcado dentro de la circunferencia (0,536) denota el nivel de significación de los datos. B. TUKEY: Los valores enmarcados en la circunferencia representan el nivel de significación comparativa entre los grupos.

A

ANOVA

DIAS

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre Grupos	125,356	2	62,678	,628	,536
Dentro de Grupos	8679,767	87	99,767		
Total	8805,122	89			

B

Post Hoc Tests

Comparaciones Múltiples

DIAS

Tukey HSD

(I) ACUARIO	(J) ACUARIO	Diferencia Media (I-J)	Error Std.	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2,00	,36667	2,57898	,989	-5,7829	6,5162
	3,00	-2,30000	2,57898	,647	-8,4495	3,8495
2	1,00	-,36667	2,57898	,989	-6,5162	5,7829
	3,00	-2,66667	2,57898	,558	-8,8162	3,4829
3	1,00	2,30000	2,57898	,647	-3,8495	8,4495
	2,00	2,66667	2,57898	,558	-3,4829	8,8162

Anexo 12. Estadísticos descriptivos calculados a partir de los datos de supervivencia de los individuos de *Elysia diomedea* bajo condiciones de inanición. Los valores enmarcados dentro de la circunferencia representan las medias.

ACUARIO		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Std.
1	DIAS	30	16,00	53,00	37,5000	10,31821
	Valid N (listwise)	30				
2	DIAS	30	17,00	52,00	37,1333	9,48223
	Valid N (listwise)	30				
3	DIAS	30	24,00	53,00	39,8000	10,14515
	Valid N (listwise)	30				

Anexo 13. Análisis estadístico de Kaplan Meier para estimar tiempo de supervivencia de *E. diomedea* con tres dietas distintas. A. Cálculo de medias. B. Cálculo de medianas. C. Prueba Log Rank. 1. *Padina* sp. 2. *Codium fragile* 3. *Pterocladia* sp.

A

ALGA	Media ^a			
	Estimado	Error Std.	95% Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
1	10,000	,917	8,204	11,796
2	12,550	,439	11,690	13,410
3	6,600	,832	4,970	8,230
Total	9,717	,539	8,660	10,773

a. Estimación está limitada al mayor tiempo de supervivencia si existen censuras.

B

ALGA	Mediana	
	95% Intervalo de Confianza	
	Límite Inferior	Límite superior
1	.	.
2	.	.
3	4,458	5,542
Total	.	.

C

	Ji-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	20,332	2	,000

Test de igualdad de distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de ALGA.

Anexo 14. Resultados del ANOVA Anidado calculado para evaluar la preferencia de *Elysia diomedea* por una especie de alga. Los valores resaltados expresan la significación de los resultados para las distintas categorías.

Los valores categóricos encontrados durante el procesamiento fueron:

Acuarios (3 niveles)

1, 2, 3

Secciones (6 niveles)

1, 2, 3, 4, 5, 6

Tamaños (2 niveles)

Grande, Mediano

Var Dep: Minutos

N: 12

Múltiple R: 0,797

Cuadrado múltiplo R: 0,635

ANOVA ANIDADO

DIAS

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.
Acuarios	43946,000	2	21973,000	,628	,571
Tamaños	207770,083	1	207770,083	5,934	,059
Secciones	53288,750	3	17762,917	0,507	,694

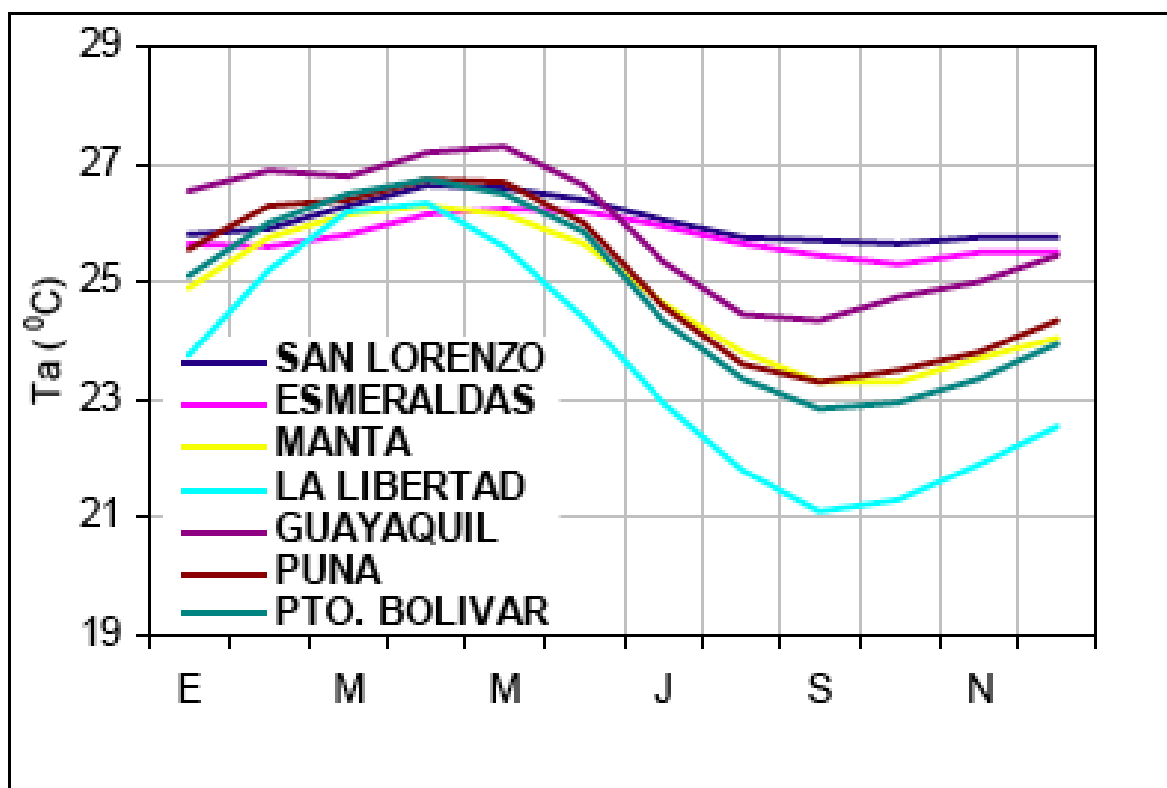
Anexo 15. Resultados del ANOVA para tiempos de permanencia de *Elysia diomedea* sobre las algas probadas para identificar preferencia. El valor enmarcado dentro de la circunferencia representa la significación de los datos.

ANOVA

TIEMPO

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre Grupos	384507,563	3	128169,188	5,138	,004
Dentro de Grupos	1097672,250	44	24947,097		
Total	1482179,813	47			

Anexo 16. Variaciones de la temperatura del aire (Ta) en zonas del litoral ecuatoriano durante los años 2005-2006. En el eje vertical se muestra la temperatura promedio del aire en grados Celcius (°C) durante los distintos meses del año, mismos que están representados en el eje horizontal (Hernández 2005-2006).



1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 <i>Elysia diomedea</i>	5
3.1.1 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS	5
3.1.2 ASPECTOS TAXONÓMICOS	6
3.1.3 BIOLOGÍA.....	6
3.1.4 METABOLITOS SECUNDARIOS	8
3.1.5 DISTRIBUCIÓN	9
3.1.6 HÁBITAT.....	10
3.1.7 DIETA	10
3.1.8 REPRODUCCIÓN Y CICLO DE VIDA.....	11
3.2 ESPECIES DE ALGAS EMPLEADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN .	12
3.2.1 <i>Codium fragile</i>	12
3.2.2 <i>Ulva lactuca</i>	13
3.2.3 <i>Padina</i> sp.....	13
3.2.4 <i>Pterocladia</i> sp.	14
3.3 OBJETIVOS	15
3.3.1 OBJETIVO GENERAL	15
3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	16
4.1.1 LOCALIDAD 1: SALINAS	16
4.1.2 LOCALIDAD 2: TONGORACHI	17
4.2 ASPECTOS METODOLÓGICOS GENERALES	18
4.2.1 TÉCNICAS DE COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE BABOSAS MARINAS.....	18
4.2.2 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE ALGAS MARINAS.....	18
4.2.3 ESTANDARIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA ENSAYOS DE LABORATORIO	20

4.3	ASPECTOS METODOLÓGICOS ESPECÍFICOS	22
4.3.1	SUPERVIVENCIA Y COMPORTAMIENTO EN RESPUESTA A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ.....	22
4.3.2	SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES DE LUZ ARTIFICIAL.....	24
4.3.3	SUPERVIVENCIA EN INANICIÓN	25
4.3.4	SUPERVIVENCIA ANTE DISTINTOS TIPOS DE DIETA.....	26
4.3.5	PREFERENCIA ALIMENTICIA.....	27
4.3.6	BIOLOGÍA REPRODUCTIVA	29
5.	RESULTADOS.....	30
5.1	SUPERVIVENCIA Y COMPORTAMIENTO DE <i>Elysia diomedea</i> EN RESPUESTA A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ	30
5.2.	SUPERVIVENCIA DE <i>Elysia diomedea</i> EN CONDICIONES DE LUZ ARTIFICIAL	31
5.3.	SUPERVIVENCIA DE <i>Elysia diomedea</i> EN INANICIÓN	32
5.4.	SUPERVIVENCIA DE <i>Elysia diomedea</i> FRENTE A DISTINTOS TIPOS DE DIETA	33
5.5	PREFERENCIA ALIMENTICIA DE <i>Elysia diomedea</i>	34
5.6	BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Elysia diomedea</i>	35
6.	DISCUSIÓN	36
6.1	SUPERVIVENCIA Y COMPORTAMIENTO DE <i>Elysia diomedea</i> EN RESPUESTA A DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ	36
6.2	SUPERVIVENCIA DE <i>Elysia diomedea</i> EN CONDICIONES DE LUZ ARTIFICIAL	43
6.3	SUPERVIVENCIA DE <i>Elysia diomedea</i> EN INANICIÓN	47
6.4	SUPERVIVENCIA DE <i>Elysia diomedea</i> FRENTE A DISTINTOS TIPOS DE DIETA	53
6.5	PREFERENCIA ALIMENTICIA DE <i>Elysia diomedea</i>	58
6.6	BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>Elysia diomedea</i>	67
7.	CONCLUSIONES	73
8.	LITERATURA CITADA.....	75
9.	FIGURAS	87
10.	TABLAS.....	120

11. ANEXOS	133
------------------	-----