BOL. SOC. BIOL. DE CONCEPCION, TOMO XLII, pp. 317-331 — 1969-1970

ESTADOS PRIMARIOS DEL DESARROLLO Y METAMORFOSIS DE *PYURA CHILENSIS* MOLINA, 1782 (Tunicata, Ascidiacea, Pyuridae)

GUIDO F. A. CEA CIFUENTES
Depto. de Biología Celular
Inst. Central de Biología
Univ. de Concepción

RESUMEN

Se estudian los primeros estados del desarrollo embrionario, larva y metamorfosis de *Pyura chilensis* MOLINA 1782, obtenidos en condiciones experimentales. La fecundación artificial se ha logrado a 15° C con un rendimiento ótpimo de 30%. Cada uno de los estados es descrito a la vez que se dan los tiempos promedios necesarios para alcanzar estas etapas del desarrollo.

SUMMARY

Early embriological stages, larva and metamorphosis of *Pyura chilensis* MOLINA 1782 have been studied under experimental conditions. Artificial fertilization at 15° C has been achieved with 30% of success. Physiological and morphological changes of each stage are described, and the mean times required to obtain such development are presented.

INTRODUCCION

En 1866 KOWALESVKY se preocupó del desarrollo embrionario y metamorfosis de *Phallusia* SAVIGNY, 1816 y *Ciona* FLEMING, 1822, determinando que las ascidias tienen rasgos morfológicos comunes con *Amphioxus* y que por lo tanto deberían considerarse como cordados. Antes se las relacionaba con los moluscos.

No cabe otra interpretación desde que todas las larvas de ascidias poseen caracteres típicos y fundamentales de cordados como ser, cuerda nerviosa dorsal hueca, motocorda ventral a la cuerda nerviosa, hendiduras branquiales que en el adulto se hacen evidentes. Todas estas relaciones, con excepción de las hendiduras branquiales, no pueden deducirse del estudio del adulto plenamente desarrollado.

Se conoce el desarrollo de algunos miembros de la familia Pyuridae (HIRAI, 1941; BERRIL, 1948; MILLAR, 1951 y 1954; SEBASTIAN, 1953; CLONEY 1961 y 1963), sin embargo el número de especies estudiadas es mínimo considerando el elevado número de especies de la familia. Si esto es válido para la familia, lo es más aún para el género *Pyura* MOLINA, 1782 con especial énfasis en las especies chilenas cuya biología en general es desconocida. Esto nos ha movido a realizar el presente estudio sobre el desarrollo embrionario, larva y metaformosis de *Pyura chilensis* MOLINA, 1782, especie sublitoral y litoral que habita en las costas de Chile y que tiene importancia económica por su valor alimenticio humano.

MATERIALES Y METODOS

Especímenes de *Pyura chilensis* MOLINA, 1782 fueron colectados, mediante sumersión, en Septiembre de 1968, desde un fondo rocoso a 3 m. de profundidad en Caleta Leandro, Tumbes, Bahía de Concepción, Chile (36° 28' 36" Lat. S. y 73° 05' 25" Long. W.).

El estudio del desarrollo se efectuó usando métodos generales (COSTELLO, 1957: xi-xv; NEEDHAM, 1959 : 564-571). Los gametos fueron obtenidos disecando el animal por la línea media anterior y luego punzando la gónada madura con una pipeta y fueron estudiados aplicando las siguientes técnicas citoquímicas con pequeñas modificaciones: PAS Shiff (SPANHOF, 1966 : 24), Feulgen y Pironina Y (MANSUETTO, 1964 : 535), Verde Jano B (LILLIE, 1965 : 286), Sudan III (DAVENPORT, 1964 : 225) y Hematoxilina de Heindenhain.

Se calculó la relación volumétrica de espermios/óvulos que produce el máximo de óvulos fecundados efectuando conteo de óvulos. Se estudió el desarrollo usando tres parejas de individuos simultáneamente, repitiendo la experiencia 10 veces a 15° C. Se utilizaron pe-

queñas cubetas de plástico de 500 ml de capacidad para mantener los embriones, a las cuales se les renovó el agua cada tres días. Debido a su opacidad, algunos estados embrionarios debieron ser aclarados manteniéndolos en glicerina durante 15 días antes de proceder a su estudio.

Las observaciones microscópicas fueron efectuadas con microscopios binoculares Leitz y Zeiss, este último dotado de condensador de fase contrastada. Las fotografías fueron tomadas con los microscopios ya citados mediante dispositivo microfotográfico adicional Mikas con telescopio de enfoque y cámara Leica modelo III g utilizando película Agfa Isopan I F 17 Din. Los dibujos fueron hechos utilizando un gran aparato de dibujo Zeiss según Abbe.

RESULTADOS

Gametos.

Espermios.— El espermio de *P. chilensis* tiene una longitud total de 29 μ y se divide en una región anterior o cabeza de 6 μ de longitud, aguzado en su extremo anterior y una región posterior o cola de 23 μ de longitud que le sirve para movilizarse (Fig. 1-A).

Al microscopio de fases contrastadas no se observa *in vivo* ninguna diferenciación en la región de la cabeza. Con colorantes vitales ésta se tiñe homogéneamente. En preparaciones fijadas con ácido ósmico y teñidas con hematoxilina de Heindenhain, la región de la cabeza es de una fuerte coloración violeta e igual coloración presenta con hematoxilina-eosina. Toda la región anterior del espermio es Feulgen positiva.

Los espermios son vaciados a través del espermioducto en la cavidad atrial de donde pasan al exterior. Los espermios en el momento de ser expulsados se encuentran formando agrupaciones cteniformes; luego al aumentar su movilidad se desprenden nadando libremente en el medio ambiente. Con las técnicas utilizadas no fue posible observar ninguna membrana que envuelva la cabeza de los espermios para formar espermatóforos (Fig. 1-B).

Ovulos: El óvulo maduro es esférico, de color verdoso y de un diámetro total de 225 μ (Fig. 1-C). Posee los mismos elementos que el ovocito de 200 μ encontrado dentro del ovario y la madurez posterior de este último consiste en un aumento de la cantidad de vitelo, lo que le hace un poco más denso y grande. El núcleo es esférico y excéntrico de 77 μ de diámetro y con un nucleolo de 14 μ ubicado levemente excéntrico en el núcleo. La excentricidad y el sentido de la desviación del núcleo con respecto al centro de la célula es similar al del nucléolo en el núcleo (Fig. 1-E).

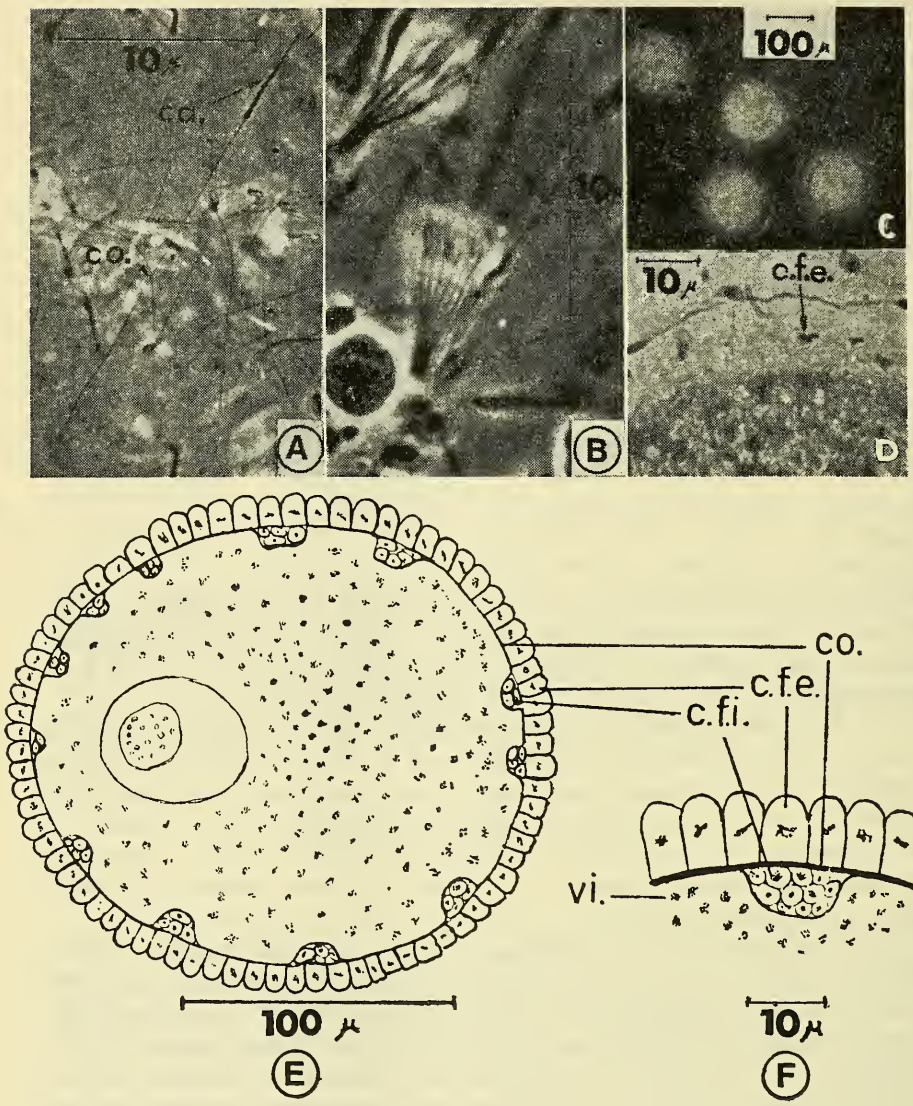

Fig. 1.— *P. chilensis* MOLINA, 1782. Gametos. A.— Espermio; ca. cabeza; co. cola. Hematoxilina de Heindenhain. B. Grupo cteniforme de espermios. Hematoxilina de Heindenhain. C.— Ovulos. Sin tinción. D.— Región periférica de un ovocito. E.— Ovocito de 200 μ (óvulo inmaduro). F.— Región periférica de un ovocito de 200 μ. n. núcleo; nuc. nucléolo; co. corion; c.f.e. células foliculares externas; c.f.i. células foliculares internas; vi. vitelo.

Periféricamente a la membrana plasmática de los óvulos, alojadas en pequeñas invaginaciones formadas por ésta y distribuídas en forma discontinua, se encuentran las células foliculares internas que alcanzan un tamaño de 6 μ, cuyo citoplasma es Feulgen y PAS-Shiff negativo. Los núcleos de estas células se tiñen normalmente con los colorantes nucleares. (Fig. 1-E y F).

El corion es una fina membrana de basamento acidófila, en contacto íntimo con la membrana plasmática del óvulo en aquellas zonas en que no hay células foliculares internas. A su vez la membrana citoplasmática se hace evidente donde se encuentra separada del corion para dejar lugar a las células foliculares internas (Fig. 1-E y F).

Las células foliculares externas son cúbicas y se ubican sobre el corion formando una sola corrida de 10 μ de alto. Es común encontrarlas en activa carioquinesis (Fig. 1-D, E y F). La cara externa de cada célula folicular es semiconvexa. El citoplasma es Feulgen y PAS-Shiff negativo.

Los componentes del óvulo normal (no centrifugado) que se han logrado localizar cualitativamente en el óvulo de *P. chilensis* están distribuídos uniformemente en el volumen de éste. Con verde Jano B el citoplasma se colorea débil pero uniformemente, lo que hace suponer una distribución homogénea de las mitocondrias. Con PAS-Shiff el citoplasma obtiene una coloración rojo-brillante uniforme debida a la distribución uniforme de los gránulos de vitelo. Con Feulgen se obtiene una débil coloración violeta en el núcleo y una coloración similar, pero un poco más intensa, en el citoplasma, donde además se hacen evidentes algunas zonas más coloreadas con aspecto de fibras. Con pironina Y se tiñen de color rosado tanto el nucléolo, que muestra numerosas vesículas esféricas incoloras, como el citoplasma. Esferas lipídicas pequeñísimas, distribuídas homogéneamente en el citoplasma, se tiñen de amarillo-anaranjado con Sudan III.

Fecundación.

Cuando los óvulos son lanzados al medio acuático, ocurra o nó fecundación, el corion comienza a separarse aparentemente por un proceso osmótico, y a visualizarse el espacio perivitelino. El óvulo llega entonces a medir alrededor de 250 μ. Aumenta la turgescencia de la membrana vitelina y las células foliculares internas son expulsadas hacia el espacio perivitelino. Al mismo tiempo las células foliculares externas comienzan a disgregarse. Cuando hay fecundación ésta se efectúa antes de ocurrir los fenómenos arriba mencionados.

Una vez ocurrida la fecundación, el único cambio visible que experimenta el huevo en la desaparición del núcleo como tal. El zigoto efectúa enseguida la reducción meiótica y expulsa dos cuerpos polares que son difícilmente observables dado que se confunden con las cé-

lulas foliculares internas. Eliminando el corion mediante una micromanipulación previa a la fecundación, se puede observar, después de ocurrir ésta, la zona de expulsión de los polocitos que marca el polo animal del huevo.

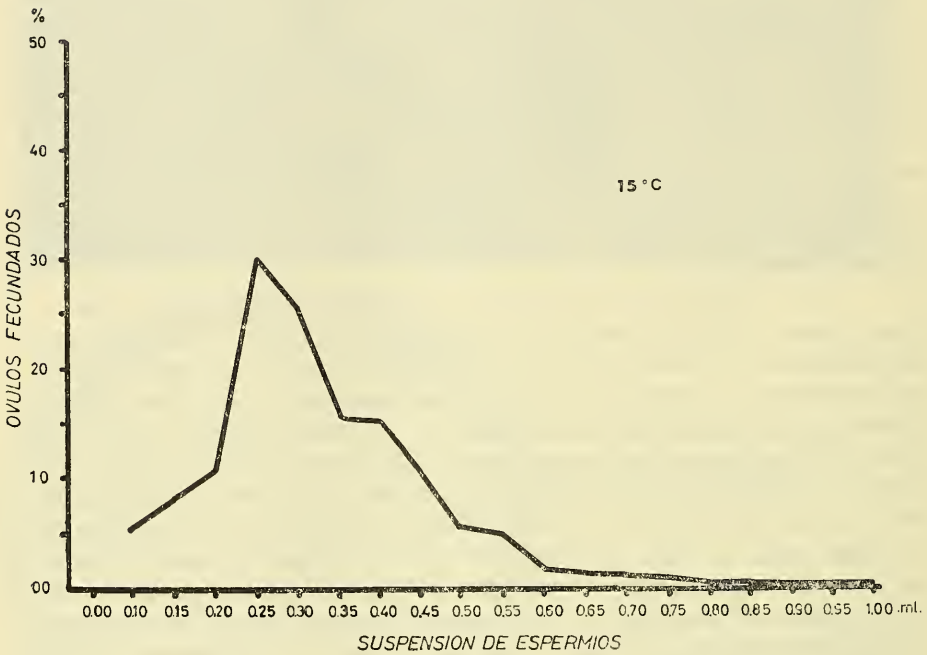

Fig. 2.— *P. chilensis* MOLINA, 1782. Porcentaje de Ovulos Fecundados en condiciones experimentales (15º C) al variar la concentración de espermios (Ver Tabla I).

En la Fig. 2 se han graficado los porcentajes de óvulos fecundados al mezclar 1 ml. de óvulos, que contiene un promedio de 3.408 óvulos, con distintos volúmenes de "espermios secos" (1) previamente preparados de tal manera que el volumen total de la suspensión de gametos en agua de mar sea de 250 ml., con una concentración de 15 óvulos por ml. Se observa que el máximo de óvulos fecundados se obtiene cuando se usan 0.25 ml. de "espermios secos".

(1) Espermios no diluídos en agua de mar.

Tabla I

PORCENTAJE (%) DE OVULOS DE *P. CHILENSIS* MOLINA, 1782, FECUNDADOS EN CONDICIONES EXPERIMENTALES (15° C)

ml: Espermios	% Ovulos fecundados
0.10	5.2
0.15	8.0
0.20	10.5
0.25	30.1
0.30	25.4
0.35	15.6
0.40	15.2
0.45	10.1
0.50	6.0
0.55	4.8
0.60	2.1
0.65	1.6
0.70	1.2
0.75	0.9
0.80	0.2
0.85	0.3
0.90	0.2
0.95	0.1
1.00	0.1

Desarrollo Embrionario y Metamorfosis.

El desarrollo de *P. chilensis* fue logrado en el laboratorio a 15° C. El tiempo que demora en formarse cada estado embrionario fue medido desde el momento de la fecundación. Debido a que no hay formación de "creciente" pigmentaria posterior a la fecundación (Fig. 3-A) y a la gran opacidad del huevo, sólo fue posible determinar los primeros clivajes.

2 células : 2 horas 20 minutos. Se produce la división meridional del huevo (de polo a polo) resultando dos células levemente desiguales (Fig. 3-B).

4 células : 3 horas 30 minutos. El blastómero menor se divide meridionalmente en dos células, una de las cuales se vuelve a dividir casi inmediatamente. El blastómero mayor permanece indiviso (Fig. 3-C).

6 células : 3 horas 55 minutos. Primer clivaje meridional y perpendicular al plano del clivaje inicial del blastómero mayor. Se completa la división de los blastómeros menores (Fig. 3-D).

8 células : 4 horas 30 minutos. Segundo clivaje del blastómero mayor, esta vez ecuatorial. En este estado el embrión se encuentra constituído por cuatro blastómeros superiores de menor tamaño, micrómeros (polo animal) y cuatro bastómeros inferiores de mayor tamaño, macrómeros (polo vegetativo) (Fig. 3-E).

16 células 5 horas 40 minutos. En esta etapa el embrión adquiere simetría bilateral mediante un leve aplastamiento dorso-ventral (Fig. 3-F).

36 células 6 horas 30 minutos. El clivaje y número de blastómeros son difíciles de precisar a partir de este estado (Fig. 3-G).

Gastrula temprana : 8 horas 45 minutos. Presenta forma de sombrero y es deprimida dorso-ventralmente. Blastoporo perfectamente visible (Fig. 3-H).

Gástrula tardía : 9 horas 40 minutos. La gástrula adquiere forma ovoide y el blastoporo se ha cerrado. El número de células es grande y el tamaño general de cada una ha disminuído considerablemente en relación al tamaño inicial del huevo (Fig. 3-I).

Neurula temprana : 10 horas 30 minutos. El embrión presenta un rudimento de la futura cola de la larva, lo que le da un aspecto piriforme. Se observa un rudimento de arquenterón (Fig. 3-J).

Neurula tardía : 11 horas 55 minutos. Tronco y cola claramente diferenciados. En el tronco el arquenterón es perfectamente visible. La cola se va enrrollando progresivamente alrededor del tronco (Fig. 3-K).

Larva temprana : 13 horas 30 minutos. Larva completamente formada y enrollada. Otolito y ocelo claramente visibles como dos manchas circulares oscuras. La cola experimenta movimientos espasmódicos leves. (Fig. 3-L).

Larva libre : 16 horas 30 minutos. Eclosión. Las larvas se desprenden del corion rasgándolo mediante una potente extensión de la cola. Las larvas nadan libremente en el agua durante aproximadamente 12 horas, pudiendo algunas hacerlo hasta por 24 horas (Fig. 3-M).

Larva libre tardía : 24 horas. Las larvas son menos activas y se observa un pequeño acortamiento y engrosamiento de la región caudal (Fig. 4-A).

Fijación al sustrato o asentamiento : 28 horas. Mediante sus tres papilas anteriores la larva se adhiere prefiriendo un sustrato rugoso (trocitos de rocas) y muy especialmente trocitos de túnica de ejemplares adultos colocados en las cubetas de cultivo. Cabe señalar que nunca ocurrió fijación sobre vidrio. La cola se reabsorbe rápidamente (en alrededor de 20 minutos) permaneciendo sólo un rudimento cónico que luego desaparece. La reabsorción ocurre tanto en las larvas asentadas como en las no asentadas a un sustrato. En estas últimas, sin embargo, no ocurre metamorfosis. La túnica externa se oblitera (Fig. 4-B).

Reabsorción de las papilas : 32 horas. Las papilas adhesivas comienzan a ser readsorbidas; al mismo tiempo se hace más gruesa la túnica interna que presenta algunas pequeñas proyecciones irregulares que se insinúan en la túnica externa (Fig. 4-C).

Formación de ampollas : 38 horas. Se han reabsorbido totalmente las papilas adhesivas; las proyecciones de la túnica interna se han transformado en ocho ampollas más o menos cónicas. Algunos individuos presentan nueve ampollas pero una de ellas es mucho más pequeña que las restantes. Al parecer estas ampollas son las que fijan definitivamente el animal al sustrato. La túnica externa se torna aplastada, flácida y de límites irregulares. Después de 50 horas la túnica externa se vuelve opaca y arrugada y parece no desempeñar ya ninguna función (Fig. 4-D).

Formación de rudimento del endostilo : 178 horas. En el centro de la masa visceral en formación aparece una línea oscura que corresponde al futuro endostilo. Aún están presentes ocelo y otolito (Fig. 4-E).

Formación de rudimentos de los sifones : 208 horas. En la región superior se observan los rudimentos de los sifones como dos puntos oscuros rodeados de algunas bandas musculares incoloras y pequeñas espículas aciculares. La branquia se distingue claramente del intestino. El otolito y el ocelo están aún presentes. La túnica interna que ha derivado en la túnica definitiva del animal se vuelve opalescente. Ha habido un pequeño aumento en el diámetro llegando el individuo a medir 300 μ y las ampollas hasta 100 μ (Fig. 4-F).

Activación de los sifones : 236 horas. Comienzan a funcionar los sifones que presentan mayor número de bandas musculares radiantes visibles e incoloras.

Pigmentación : 258 horas. Los sifones adquieren coloración rosado-pálido. Ha desaparecido el ocelo y el otolito. La túnica se torna opaca.

Descripción de la Larva (Fig. 3-M).

La larva de *P. chilensis* es aplanada bilateralmente, de color pardo-verdoso. Mide alrededor de 850 μ de largo y consta de dos regiones: 1) un tronco o región anterior de 190 μ de longitud, 140 μ de alto y 110 μ de ancho; y 2) una cola o región posterior, que utiliza en la natación, de 660 μ de largo, 70 μ de alto y 40 μ de ancho. Externamente la larva se encuentra envuelta por la túnica que está formada por dos capas: una interna muy delgada y la externa más gruesa que forma tres aletas impares transparentes: la aleta dorsal y la aleta ventral están ubicadas en el plano sagital de la larva y se unen en la región posterior de la cola, para ensancharse levemente después formando la aleta posterior que mide aproximadamente 190 μ de largo por 60 μ de alto.

El tronco posee tres papilas anteriores, dos dorsales y una ventral que sirven a la larva para fijarse a un sustrato y efectuar su posterior metamorfosis. Cerca de la superficie dorsal del tronco se encuentra una zona clara que corresponde a la vesícula nerviosa, la cual

contiene al otolito y al ocelo separados por una distancia próxima a 35 μ. El otolito es de posición ventral y se presenta como una mancha circular negra de 10 μ de diámetro, mientras que el ocelo es pósterodorsal y se presenta como una masa de pigmento negro de 12 μ de diámetro. Inmediatamente debajo de la vesícula cerebral se observa una masa celular oscura en forma de media luna con sus dos extremos dirigidos hacia arriba, que corresponde al arquenterón. No se observan rudimentos de los futuros sifones. La cola contiene la notocorda de color oscuro y rodeada de tejido muscular. Hacia la superficie de la cola de la larva se encuentran algunas gotas de material refringente.

DISCUSION

BERRIL (1950 : 258) estimaba que era muy difícil efectuar fecundación artificial en los Pyuridae. En efecto, en *P. chilensis* una baja cantidad de óvulos resultan fecundados al mezclar gametos de dos individuos distintos artificialmente. A nuestro juicio el bajo rendimiento de óvulos fecundados se debe principalmente a dos razones: 1) a que inmediatamente después que el óvulo es expulsado al medio acuático, comienza a separarse el corion y aumenta el espacio perivitelino, después de lo cual no puede ocurrir la fecundación; y 2) a que los espermios se presentan en grupos cteniformes cuando son recién extraídos.

El mejor rendimiento se obtiene efectuando una mezcla de óvulos recién extraídos con espermios que ya han estado en el agua un tiempo suficiente para individualizarse, en proporciones adecuadas; en estas condiciones la cantidad de óvulos fecundados es aún relativamente baja (alrededor de un 30%), por lo que se presume existirían otros factores desconocidos que en condiciones artificiales impiden la fecundación de una mayor proporción de óvulos.

Cuando ocurre la fecundación del óvulo de *P. chilensis* desaparece el núcleo y son expulsados los dos cuerpos polares. A diferencia del huevo de *P. squamulosa* que presenta una creciente anaranjada (MILLAR, 1951 : 27) y de *P. microcosmus,* que presenta una creciente café-grisáceo (MILLAR, 1954 : 403) luego de ser fecundados, en *P. chilensis* no hay formación de creciente pigmentario.

El clivaje posterior del huevo de *P. chilensis* al parecer sigue el modelo bien conocido en ascidas establecido por CONKLIN 1905 : 37), y la eclosión de la larva se lleva a efecto aproximadamente a las 16 horas (15° C) de ocurrida la fecundación, tiempo mucho más corto que en otras especies de Pyuridae. En *Pyura microcosmus* y *P. squamulosa* entre 18° C y 20° C, la eclosión de la larva ocurre aproximadamente a las 20 horas de la fecundación (MILLAR, 1951 : 27, 1954 : 406). En *Boltenia villosa* STIMPSON, 1864, ocurre a las 33 horas a 12° C (BERRIL, 1950 : 258).

HIRAI (1951 : 83) en un estudio comparado de la morfología de las larvas de ascidias, incluye a los Pyuridae en el tipo larval I. La morfología y tamaño de la larva de *P. chilensis* es muy similar a la del resto de los Pyuridae y la disposición de sus papilas adhesivas en triángulo, dos dorsales y una ventral, sin pedúnculo ni procesos epiteliales y la ausencia de rudimentos de órganos, permiten incluirla en el tipo I de HIRAI. Por otra parte, la presencia de un ocelo bien desarrollado es una condición primitiva (MILLAR, 1951 : 30).

La reabsorción de la cola ocurre en larvas fijas y no fijas a un sustrato; sin embargo, el desarrollo se completa sólo en las larvas fijas. El proceso de reabsorción de la cola ha sido estudiado en *Pyura haustor* STIMPSON, 1864, demostrándose que se efectúa por una ruptura del cemento intercelular y fuerzas ligantes entre las células notocordales y musculares (CLONEY, 1961 : 73 y 1963 : 251, GRIM y CLONEY, 1965 : 643). En *P. chilensis* este mecanismo podría ser similar puesto que ocurre un engrosamiento de la región caudal, acompañado de un recogimiento del tejido muscular al mismo tiempo que ocurre la disociación celular.

Es notorio que las larvas de *P. chilensis* presentan una selectividad por el sustrato al momento de la fijación, prefiriendo los rugosos y en particular la túnica de otros ejemplares. Esto podría dar una explicación a la disposición de los individuos en agregaciones, en su medio natural, considerando también que el corto tiempo de vida libre no les permite alejarse mucho de la población, a menos que sean arrastrados por las corrientes de agua.

Durante el curso de la metamorfosis aparecen en la túnica interna ocho (o nueve) procesos irregulares papuliformes, que se insinúan en la túnica externa. En el caso de existir nueve procesos, uno es mucho más pequeño que los ocho restantes. Estas ampollas se forman en varias especies de Pyuridae. *Halocynthia* y *Boltenia* poseen cuatro ampollas mientras que otros *Pyura* poseen ocho (MILLAR, 1951 : 307; HIRAI, 1966 : 176). El número de ampollas es característico de cada especie y su función en *P. chilensis* parece ser la de secretar una sustancia comentante que fija definitivamente el individuo al sustrato.

El desarrollo premetamórfico y metamórfico finaliza cuando los sifones han comenzado a funcionar, después de alrededor de 10 días, lo que indica que el individuo está filtrando agua y por lo tanto, respirando y alimentándose. Durante todo el proceso el alimento utilizado ha sido la gran cantidad de vitelo que posee el huevo. La duración del período embrionario y metamórfico de *P. chilensis* a 15°C es relativamente corto comparado con otros *Pyura* de aguas más cálidas; así *P. microcosmus* completa su metamorfosis a los 16 días entre 18° C y 20° C (MILLAR, 1954-406).

LITERATURA CITADA

BERRIL, N. J.
1948 The nature of the ascidian tadpole, with reference to *Boltenia echinata*. *J. Morphol.* 82 : 269-285.

BERRIL, N. J.
1950 The Tunicate, Roy Soc., London. 133 : 1-354.

CLONEY, R.; DAVISON, A. Y FOX, M.
1961 Observations on the Mechanism of Tail Resorption in Ascidians. *Amer. Zool. 1* : 67-87.

CLONEY, R.; DAVISON, A. Y FOX, M.
1963 The significance of the caudal epidermis in Ascidian metamorphosis. *Biol. Bull.* 124(3) : 241-253.

CONKLIN, E. G.
1905 The Organization and Cell-Lineage of the Ascidian Egg. *J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia,* ser. 2. 13 : 1-119.

COSTELLO, D. P.; DAVIDSON, M. D.; EGGERS, A.; FOX M. H.; HENLEY, C.
1957 Methods for Obtaining and Handling Marine Eggs and Embryos. Lancaster Press, Inc., Lancaster, Penna.

DAVENPORT, H.
1964 Histological and Histochemical Technics. W. B. Saunders Company, London.

FRANZEN, A.
1958 On sperm morphology and acrosome filament formation in some Annelida. Echiuroidea and Tunicata. *Zool. Bidrag-Uppsala.* 33 : 1-30.

GRIMM, L. Y CLONEY, R.
1965 Ultraestructural study of Ascidian Metamorphosis, Blood Cell Migration Across the epidermis. *Amer. Zool. 5*(4) : 643.

HIRAI, E.
1941 An outline of the development of *Cynthia roretzi* DRASCHE. *Sci. Rep. Tohoku Univ.,* ser. 4 *Biol. 16*(3) : 257-261.

HIRAI, E.
1951 A comparative study on the structures of the tadpoles of Ascidians. *Sci. Rep. Tohoku Univ.,* ser. 4 Biol. *19*(1) : 79-87.

HIRAI, E.
1966 On differentiation of ampulla of larva of an Ascidian, *Halocynthia roretzi. Bull, mar. biol. Sta. Asamushi Tohoku Univ. 12*(4) : 175-177.

LILLIE, R. D.
1965 Histopathologie and Practical Histochemistry. 3ª Ed. McGraw-Hill Book Company, London.

MANSUETO, C.
1964 Ricerche citologiche e citochimiche concernenti la oogenesi di *Ciona intestinalis. Ric. Sci. Italy. 4*(4) : 529-542.

MILLAR, R.
1951 The Development and Early Stages of the Ascidians *Pyura squamulosa* (ALDER). *J. mar. biol. Ass.* U. K. *33* : 27-31.

MILLAR, R.
1954 The Development of the Ascidian *Pyura microcosmus* (SAVIGNY). *J. mar. biol. Ass.* U. K. *33* : 403-407.

NEEDHAM, J. G.; GALTSOFF, P. S.; LUTZ, F. E.; WELCH, P. L.
1937 Culture Methods for Invertebrate Animals. Dover Publications, Inc. New York.

SEBASTIAN, V. O.
1953 The development of *Herdmania pallida* (HELLER). *Proc. Indian Acad. Sci.* B. *17* : 174-187.

SPANHOF, L.
1966 Histoquímica práctica. Acribia, Zaragosa.

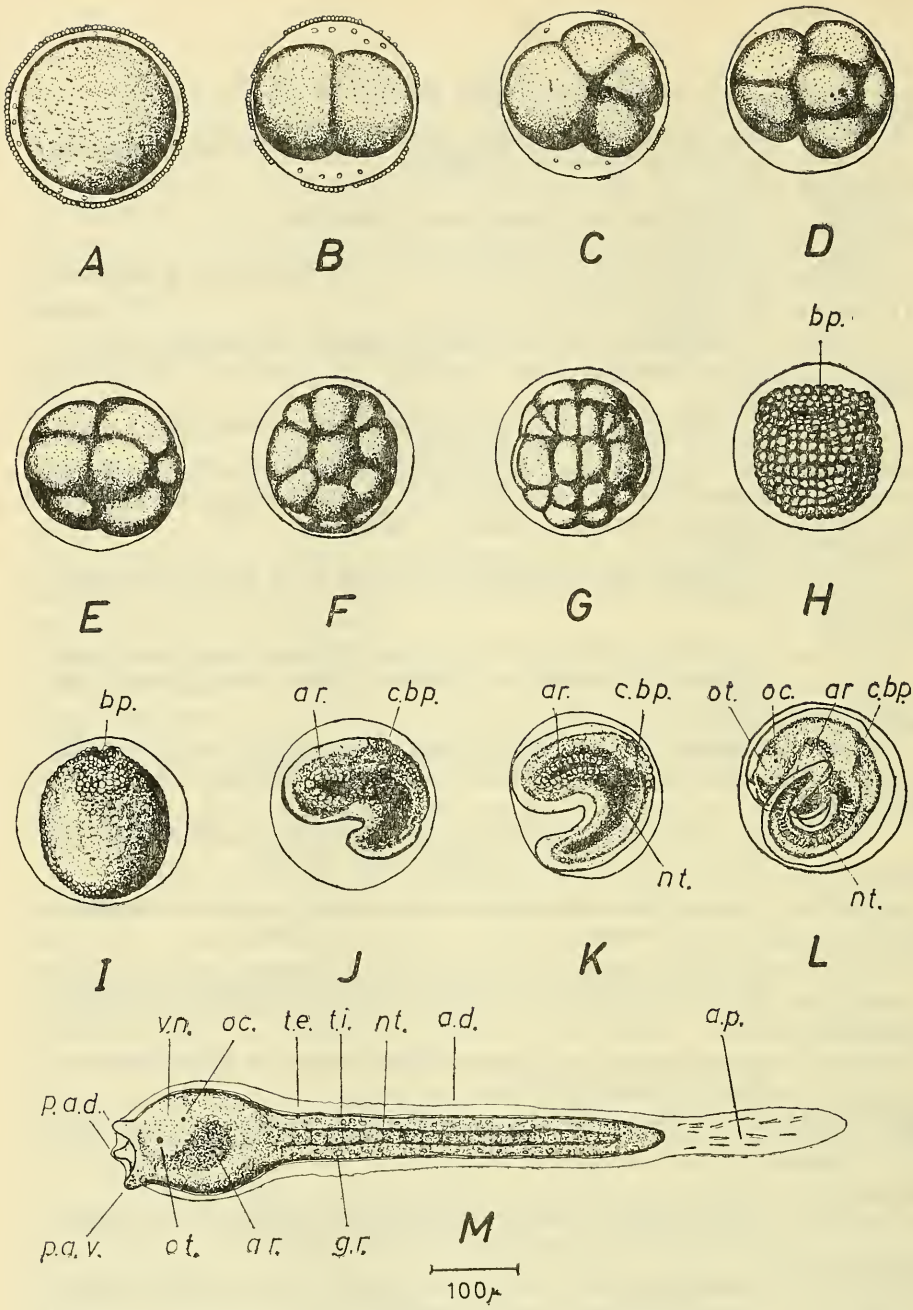

Fig. 3.— *P. chilensis* MOLINA, 1782. Desarrollo Embrionario. A.— Ovulo fecundado. B.— Estado de 2 células. C.— Estado de 4 células. D.— Estado de 6 células. E.— Estado de 8 células. F.— Estado de 16 células. G.— Estado de 36 células. H.— Gástrula temprana. I.— Gástrula tardía. J.— Neurula temprana. K.— Neurula tardía. L.— Larva temprana. M.— Larva nadadora. b. blastoporo; ar. arquenterón; c.bp. cerradura del blastoporo; nt. notocorda; p.a.d. papilas adhesivas dorsales; p.a.v. papilas adhesivas ventrales; v.n. vesícula nerviosa; oc. ocelo; t.e. túnica externa; t.i. túnica interna; a.d. aleta dorsal; a.p. aleta posterior; a.v. aleta ventral; ot. otolito; g.r. gotos refringentes.

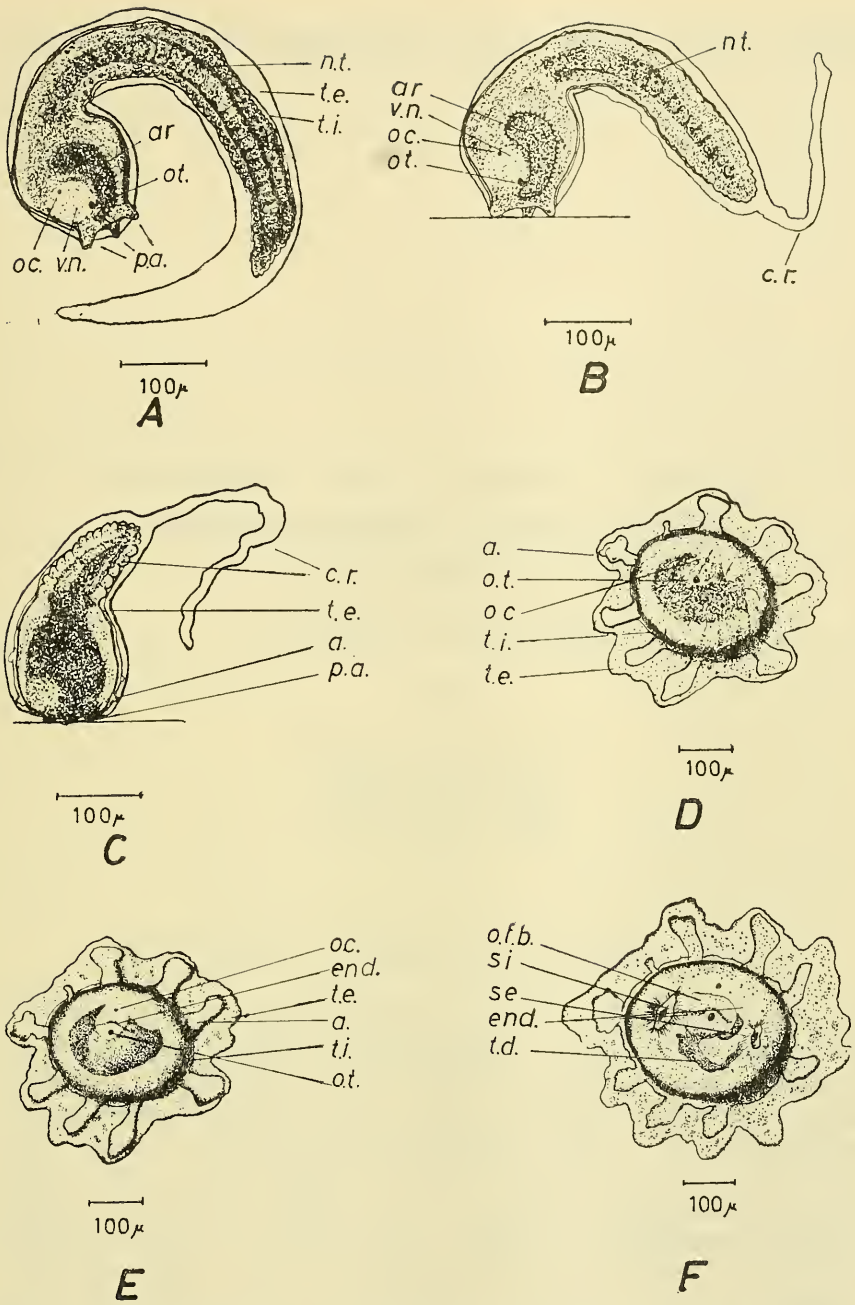

Fig. 4.— *P. chilensis* MOLINA, 1782. Metamorfosis. A.— Larva tardía. B.— Asentamiento de la larva. C.— Reabsorción de la cola y papilas adhesivas de la larva. D.–, E.— y F.— Vista superior del animal durante las etapas siguientes de la metamorfosis: a. arquenterón; nt. notocorda; p.a. papilas adhesivas; v.n. vesícula nerviosa; oc. ocelo; t.e. túnica externa; t.i. túnica interna; ot. otolito; a. ampollas; e. endostilo; s.i. sifón inhalante; s.e. sifón exhalante; t.d. tubo digestivo.