

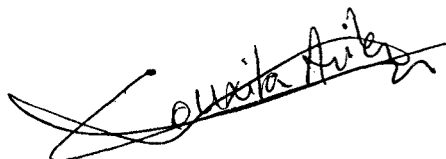
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**SUSTANCIAS NATURALES DE MOLUSCOS OPISTHOBANQUIOS:
ESTUDIO DE SU ESTRUCTURA, ORIGEN Y FUNCION
EN ECOSISTEMAS BENTONICOS.**

VºBº de los Directores de la
Memoria:
Dr. Manuel Ballesteros, Profesor
Titular del Departamento de Biología
Animal de la Universidad de Barcelona.



Memoria redactada por Conxita
Avila Escartín, para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Barcelona.



Dr. Guido Cimino, Director del I.C.M.I.B.
C.N.R.-Arco Felice, Nápoles, Italia.



Barcelona, Marzo de 1993.

5.5. *Hypselodoris tricolor* (Cantraine, 1835).

5.5.1. Introducción.

5.5.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Esta especie ha sido a menudo confundida con los juveniles y adultos de otras especies, como por ejemplo *H. fontandraui*, *H. orsini* y *H. villafranca*. No es, por ello, de extrañar que tanto las descripciones morfológicas, así como su ecología, alimentación, etc., deban ser reexaminadas antes de atribuirles con certeza a esta especie.

Doris tricolor.- Cantraine (1835, 1841).

Chromodoris tricolor.- Ihering (1880).

Glossodoris tricolor.- Vicente (1967); Haefelfinger (1969a y b); Ros (1975, 1976a); Ortea (1975, 1977).

Hypselodoris tricolor.- García (1983); Ballesteros (1980); Medina *et al.* (1985, 1986a y b, 1987, 1988a y b); Luque (1983, 1986); Ballesteros *et al.* (1986a y b); Medina y García (1987); Fontana *et al.* (*en prensa*).

Hypselodoris messinensis.- Ballesteros (1980); Cattaneo *et al.* (1990).

Hypselodoris cf. tricolor.- García *et al.* (1991).

Hypselodoris atlantica.- Gosliner (1990).

5.5.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Presenta el borde del manto amarillo, con una línea amarilla o blanca en los flancos, que continúa por la cola, y otra central desde delante de los rinóforos hasta la branquia. Los rinóforos no presentan pigmento amarillo, al igual que la branquia, que presenta entre 8 y 10 hojas branquiales.

5.5.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

García (1984) citó en el borde posterior del manto unos "acúmulos glandulares esféricos" (MDFs). García *et al.* (1991) describieron exclusivamente MDFs posteriores para 8 ejemplares supuestamente de esta especie (*H. cf. tricolor*). Encontraron 2 MDFs de 500 μm en ejemplares de 10 mm de longitud, y 4 MDFs de 900 μm en ejemplares mayores (14-20 mm). Estos autores describieron su histología y realizaron algunos análisis histoquímicos.

Medina *et al.* (1985, 1986a y b, 1987, 1988a y b) y Medina y García (1987), han realizado varios trabajos sobre el aparato reproductor de esta especie. Concretamente describieron la gónada, la evolución del acrosoma del espermatozoide y la espermiogénesis.

Ecológicas.

Ros (1978a) ha citado esta especie en varios tipos de comunidades: praderas de fanerógamas (en hojas y rizomas) y en sustratos duros de las zonas mediolitoral, infralitoral y circalitoral, así como en ambientes portuarios y contaminados.

En cuanto a su alimentación, el mismo autor lo ha incluido en el grupo de zoófagos: micrófagos (ramoneadores, suctores): de esponjas y concretamente cita las siguientes especies: *Cacospongia scalaris*, *Ircinia fasciculata* y *Petrosia ficiformis* (?).

Ros (1976b) menciona el hecho de que su morfología "aplastada" podría ser un tipo de cripsis. En cuanto a los círculos miméticos que el mismo autor describió, esta especie fue incluida en el grupo I (grupo A, Ros, 1977). El mismo autor señaló también la exhibición individual y de grupo como estrategia defensiva en esta especie y realizó algunos experimentos con peces.

Ros (1976b) menciona además la posible confusión de esta especie con los juveniles de *H. villafranca* y otras especies del género.

Químicas.

La referencia de Cimino *et al.* (1982) para *H. tricolor* se refiere sin duda a *H. orsini*, al igual que Cimino *et al.* (1991d), y es consecuencia de la confusión que ha existido, y ya hemos comentado, entre estas especies.

5.5.2. Material estudiado.

Se han utilizado para este estudio 40 animales capturados en Las Llanas (Asturias) en Diciembre-1989 y 2 ejemplares procedentes de Santander (27-III-90). Otro ejemplar fue capturado en St. Jean de Luz (14-IV-91).

Todos ellos fueron capturados en la zona intermareal, excepto algunos ejemplares de Las Llanas que se recogieron en inmersión. De todos ellos se efectuó un estudio químico, así como se observó la rádula de algunos de ellos (excepto para el ejemplar de St. Jean de Luz).

5.5.3. Resultados y discusión.

5.5.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

Los ejemplares de esta especie presentaban una línea blanca-amarillenta central en la parte dorsal del manto, y una línea blanca longitudinal en los flancos del pie. Los tamaños medidos en 6 ejemplares fueron: 5, 7, 10, 10, 10 y 12 mm, respectivamente. Morfológicamente todos los ejemplares capturados eran iguales.

Formaciones dérmicas del manto.

El número de MDFs se detalla en la Tabla 5.30. Puede observarse que no se hallaron MDFs anteriores, coincidiendo con García *et al.* (1991).

Número	MDFs anteriores	posteriores	Tamaño
1	0	5	1 cm
1	0	5	1 cm

Tabla 5.30. Número de MDFs en dos ejemplares de *H. tricolor* asturianos.

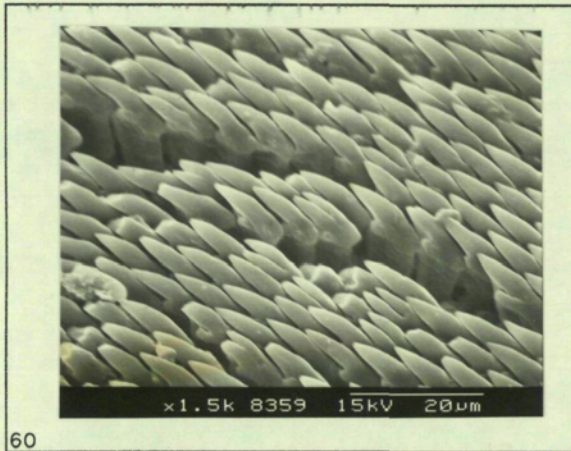
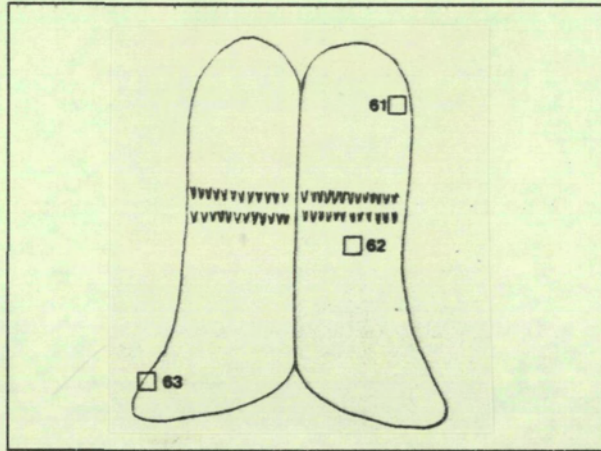
El número de MDFs obtenido por García *et al.* (1991) es ligeramente inferior a estos datos, indicando la presencia de 2 a 4 MFDs.

Si bien en este estudio no se ha analizado la estructura de las MDFs, hay que destacar que García *et al.* (1991) las describieron como estructuras esféricas con una cápsula externa que rodea la acumulación de células vacuolares. Dicha capsula está formada por fibras musculares orientadas en todas las direcciones y es fina en comparación con las otras especies estudiadas por estos autores. Bajo la cápsula hay una capa de células continua en la que se ven algunos núcleos, pero no los límites intercelulares. Entre las células vacuolares estos autores observaron algunas células que contenían gránulos citoplasmáticos densos. Además hay células vacuolares libres en el tejido conjuntivo subepidérmico y en la epidermis.

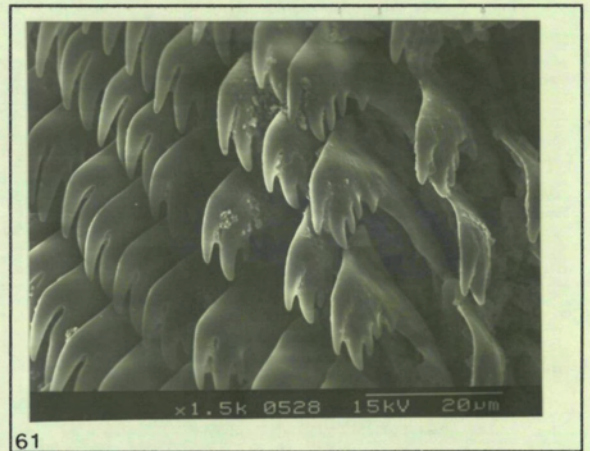
Rádula y armadura labial.

Se han estudiado las rádulas de 3 ejemplares y sus armaduras labiales respectivas. Las fotografías más destacables se incluyen en la página siguiente (60 a 63). Las fórmulas radulares de estos ejemplares, y las descritas para otros lugares se pueden ver en la Tabla 5.31. En estos ejemplares, procedentes del Atlántico, se pueden ver dos tipos de uncinos en

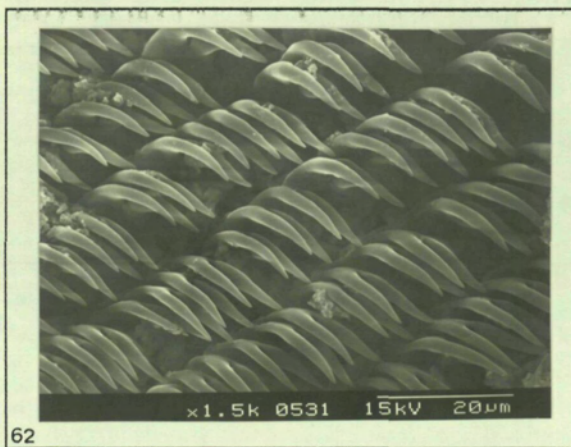
Hypselodoris tricolor



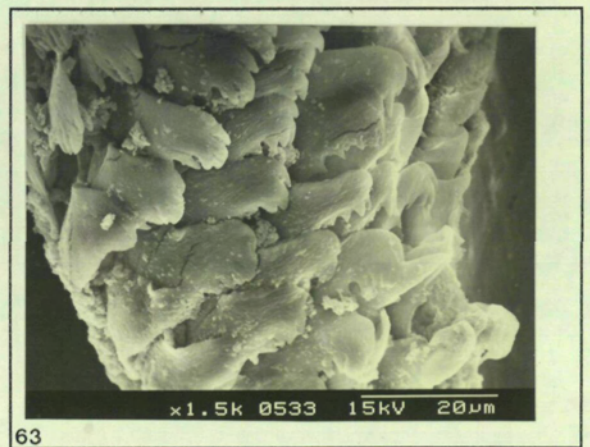
60



61



62



63

la armadura, simples y bífidos (ver fotografía 60). Según Ortea y García (*en prensa*), la armadura presenta uncinos simples en los ejemplares de Alborán y Sicilia, y bífidos en el Atlántico.

Número de filas	Número de dientes	Localidad	Referencia
51	61-0-61	Las Llanas	esta
60	58-0-58	Las Llanas	esta
48	47-0-47	Las Llanas	esta
53	49-0-49	Asturias	Ortea y García (<i>en prensa</i>)
62	58-0-58	Asturias	idem
62	56-0-56	Gibraltar	idem
48	44-0-44	Sicilia	idem
46	32-0-32	Canarias	idem

Tabla 5.31. Fórmulas radulares de *H. tricolor*.

Los dientes de la rádula son bicúspides, con tres dentículos en el segundo diente. Estos dentículos, bien formados, pueden verse en las fotografías (61 y 63). Los dientes de la zona central eran más aplanados que el resto. Los ejemplares en los que se estudiaron las rádulas medían alrededor de 10 mm.

Como puede verse en la Tabla 5.31. estos valores coinciden con los descritos por Ortea y García (*en prensa*). Según estos autores, pueden presentar tres o cuatro dentículos, mientras que los dientes externos se vuelven placas triangulares apenas dentadas.

5.5.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: estructura.

Ejemplares de Santander. De dos ejemplares enteros se obtuvo un extracto acetónico de 4.2 mg y un peso seco de 16.7 mg. La placa calibrada en éter de petróleo mostró un patrón similar a los ejemplares asturianos (que se

verán a continuación) y a *H. cantabrica* asturiano. Se observó que no había longifolina, sino otros 4 furanos con rf entre 0.6 y 0.7, de colores violeta, lila y rosa (de abajo a arriba), siendo posiblemente el de color lila el nakafurano-9. Estos resultados se confirmaron mediante una placa impregnada con AgNO₃, con heptano-benceno 1-1.

Ejemplares de Asturias. Se obtuvo el extracto a oscuras de 3 animales de Las Llanas. Se disecaron y se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla 5.32.

	peso seco	extracto acetónico
MDFs posts (15) + borde del manto	2.9	0.9
resto del manto y parte externa	8.1	4.8
glándula digestiva	17.0	5.7
resto de vísceras	5.5	1.6

Tabla 5.32. Análisis químico de *H. tricolor* (datos en mg).

La placa cromatográfica calibrada en éter de petróleo nos mostró algo de longifolina (violeta, rf 0.3), y 4 furanos más, (rosas, marrones y azules) de rf entre 0.6 y 0.7, y un quinto compuesto que parecía ser una mezcla de varios a rf 0.78, de color fucsia. El producto de color marrón más abundante en la glándula digestiva podría ser la dendrolasina. En dicha glándula es donde se concentra la mayor cantidad de todos los furanos mencionados, seguido del extracto de las MDFs. Se hizo también la correspondiente placa en heptano-benceno 1-1, impregnada de AgNO₃, con referencia de nakafurano-9 y dendrolasina y se comprobó que mediante TLC parecían ser estos productos.

Del total de 32 animales de la colección de Diciembre-1989, se obtuvieron 51 mg de extracto etéreo, de los cuales se separaron, mediante GC-MS, los furanosesquiterpenos que se indican en la Tabla 5.33.

Furanosesquiterpeno	cantidad
longifolina	0.05 mg/animal
tavacfurano	0.05 mg/animal
mezcla de varios (nakafurano-9, dendrolasina, <i>iso</i> -nakafurano-9, <i>ent</i> -furodysinina, agassizina, <i>iso</i> -dehidro-dendrolasina)	0.14 mg/animal

Tabla 5.33. Productos hallados en *H. tricolor*.

Las fórmulas de todos estos compuestos se pueden observar en la Figura 5.3. (*H. cantabrica*), junto con las referencias anteriores a algunos de estos productos (apartado 5.1.).

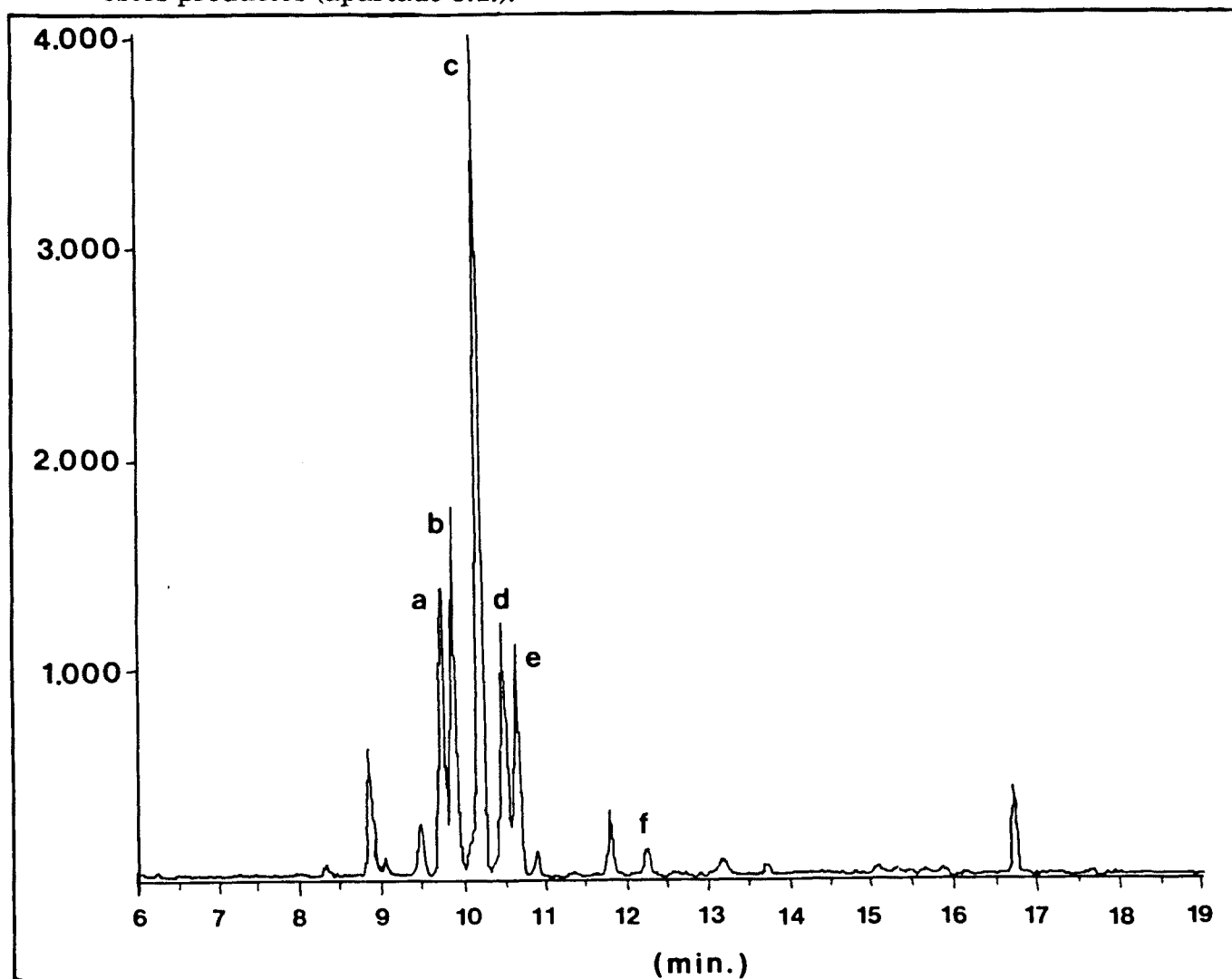


Figura 5.13. Perfil GC del extracto de *H. tricolor* (a= *iso*-nakafurano-9; b= dendrolasina; c= nakafurano-9; d= *iso*-dehidro-dendrolasina; e= *ent*-furodysinina; f= agassizina).

En la Figura 5.13. se puede observar el perfil GC de *H. tricolor*. La cantidad total de furanos por animal es de 0.24 mg.

Secreciones externas y pH. Se obtuvo un pH neutro (pH= 7) del manto del ejemplar capturado en St. Jean de Luz.

Origen de los productos.

Se han realizado varios experimentos de predación con el ejemplar procedente de St. Jean de Luz. Se utilizaron diversas esponjas (*Dysidea avara*, *D. fragilis* y *Cacospongia mollior* de Blanes) en recipientes con agua de mar. Los resultados de los tres experimentos realizados fueron contradictorios. En el primero, el nudibranquio no se paró sobre ninguna de las dos esponjas (*D. fragilis* y *C. mollior*), y estuvo en movimiento durante las 6 horas que duró el experimento. En el segundo, (con *D. avara* y *C. mollior*), el ejemplar se detuvo sobre *D. avara* desde el minuto 45 a las 2 horas, observándose en tres ocasiones como comía. El tercer experimento, con *D. avara* y *C. mollior*, resultó lo contrario, ya que el ejemplar se detuvo sobre *C. mollior* durante una hora, si bien no fue observado que mordiera con claridad la esponja.

Ros (1978a), como ya se ha dicho, citó "*Cacospongia scalaris*, *Ircinia fasciculata* y *Petrosia ficiformis(?)*" como sus presas. Estas esponjas podrían parecerse más a la dieta de *H. orsini*, como se comenta más adelante, que a la de *H. tricolor*, y es consecuencia de la confusión existente entre estas especies.

Ortea y García (*en prensa*) citan que esta especie come, al menos en el Cantábrico asturiano, la esponja *Dysidea avara*, si bien los productos que presenta *H. tricolor* no coinciden con el tipo de productos hallados en *D. avara* por Minale *et al.* (1974) y De Rosa *et al.* (1976). Este hecho podría

explicarse por la posible variación de los metabolitos presentes en *D. avara*, tal y como se ha descrito para *D. fragilis* (ver capítulos 5.1., 5.3., 5.4. y 7.1.1.).

Función.

La actividad de los compuestos hallados en esta especie ha sido ya expuesta en la Tabla 5.8.

5.5.3.3. Resumen conclusivo.

Los resultados del análisis químico confirman que *H. tricolor* presenta una mezcla de furanosesquiterpenos que obtiene de la depredación selectiva sobre esponjas (posiblemente *D. avara* o similares). La localización de estas sustancias en las MDFs, al igual que en otras especies, sugiere el uso de la misma estrategia defensiva ya descrita para otras especies del género (ver por ejemplo *H. cantabrica*).

H. tricolor presenta longifolina, tavacfurano, nakafurano-9, dendrolasina, agassizina, *ent*-furodysinina, *iso*-nakafurano-9 e *iso*-dehidrodendrolasina.

5.6. *Hypselodoris* sp.

5.6.1. Introducción.

5.6.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio.

Esta especie, por sus características, no puede ser incluida en ninguna de las especies descritas del Mediterráneo, por lo que constituye una especie nueva, que está siendo estudiada con mayor detalle y más ejemplares por J. Ortea (datos no publicados).

5.6.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Esta especie presenta un color de fondo azul oscuro con el borde del manto naranja (en la zona de las MDFs posteriores el color es azul más claro). Una línea central blanca y gruesa va desde los rinóforos hasta las branquias, rodeándolas y siguiendo hasta la cola. Una o dos líneas blancas o azuladas acompañan a esta línea central, a ambos lados. Los rinóforos presentan una línea blanca en su parte posterior, y las hojas branquiales, en número de 6 a 8, presentan el raquis blanco. Una línea blanca se sitúa en la parte central de la cola, uniéndose en su parte distal con la línea blanca que recorre los flancos del pie hasta la cola.

5.6.2. Material estudiado.

Se analizaron 7 animales procedentes de Castellammare di Stabia (12-XII-88), recogidos a unos 8 m de profundidad en piedras y bloques de cemento sobre un fondo fangoso cercano al puerto. Otro ejemplar fue capturado en Massa Lubrense (1-IV-90), sobre una roca a -10 m. Así pues, se estudiaron en total 8 ejemplares.



64



65

5.6.3. Resultados y discusión.

5.6.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

La coloración de uno de los animales, de 8 mm de longitud máxima, se describió del siguiente modo: cuerpo azul muy oscuro, con el borde del manto naranja rojizo, una línea central blanca hasta la altura de las branquias, y dos líneas azul claro a los lados de la línea blanca (ver el esquema de la Figura 5.14. y fotografías 64 y 65).

Se observó que presentaban espículas en la parte anterior del manto, en el borde. Uno de los ejemplares presentaba una ligera diferencia externa respecto al resto, ya que había más líneas blancas y azul claro paralelas a la línea blanca central, que era en este caso más fina que en los anteriores.

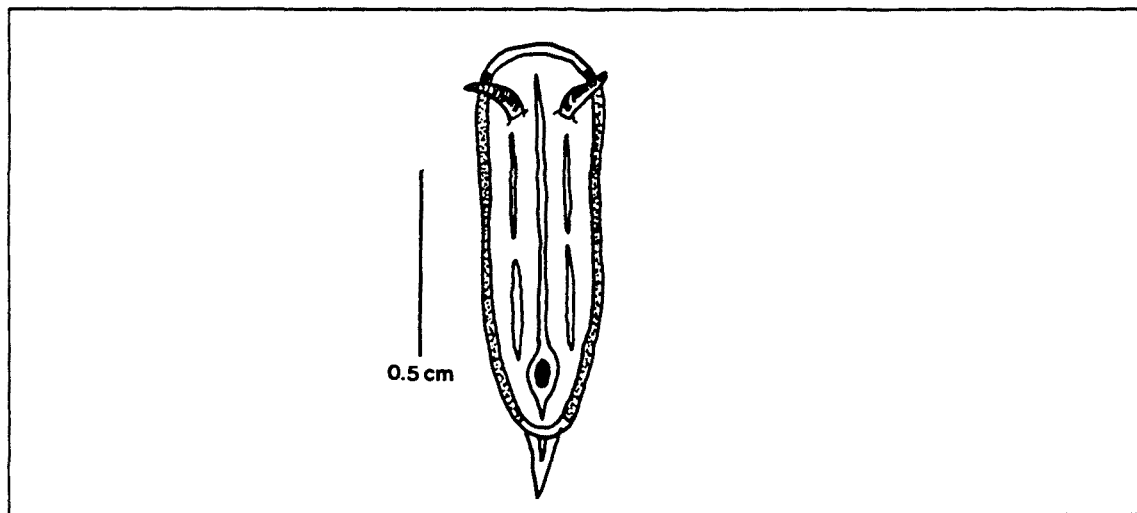


Figura 5.14. Esquema externo del ejemplar de Massa Lubrense.

Formaciones dérmicas del manto.

Se contabilizaron las MDFs de 5 de los ejemplares capturados. El número de MDFs halladas se expone en la Tabla 5.34.

Número de animales	MDFs anteriores	MDFs posteriores
1	3+2	7
1	2+1	5
1	5+3	11
1	3+2	7
1	0+0	5

Tabla 5.34. Número de MDFs de algunos de los ejemplares estudiados.

Su situación en el animal es la misma que en *H. villafranca* (ver Figura 5.9.).

Las MDFs posteriores de un ejemplar fueron fijadas para microscopía electrónica, pero debido a algún problema de fijación no pudieron ser estudiadas al MET. Se observaron, sin embargo, los cortes semifinos al microscopio óptico, hallándose una estructura aparentemente similar a la descrita para las MDFs de las especies anteriormente estudiadas.

Rádula y armadura labial.

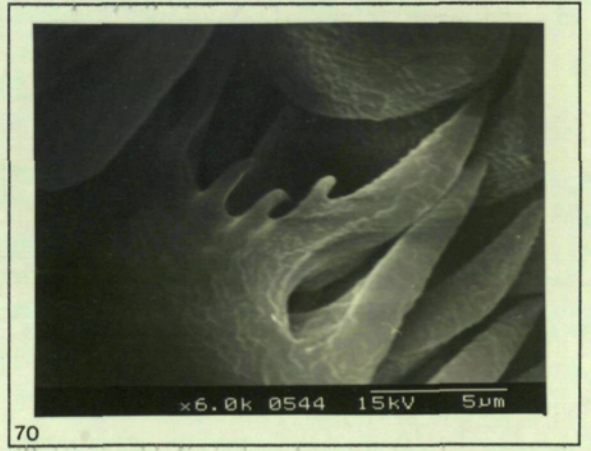
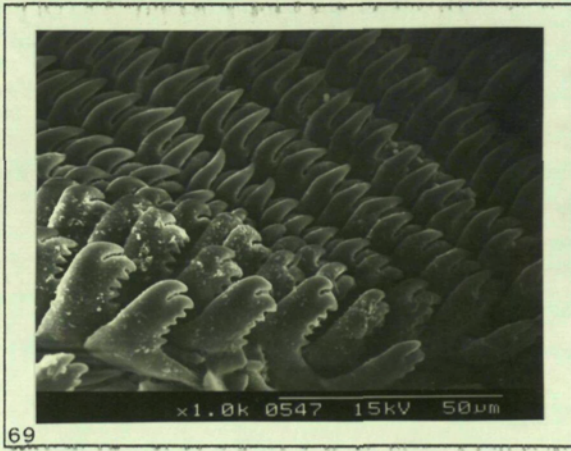
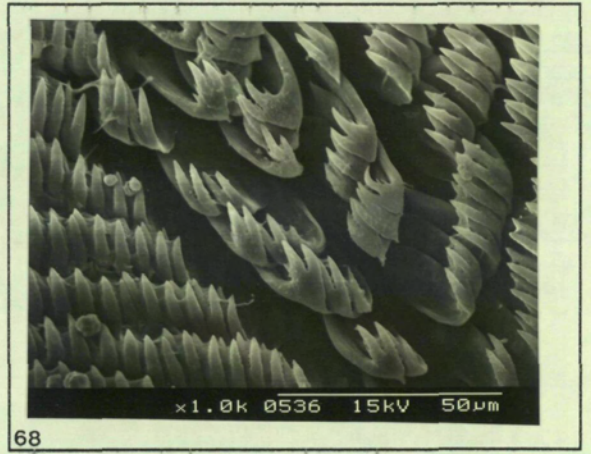
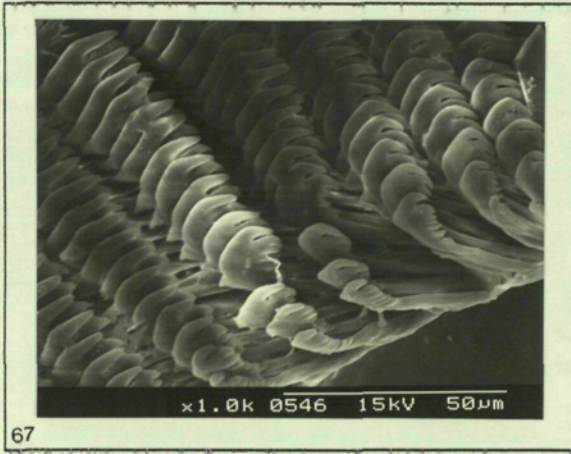
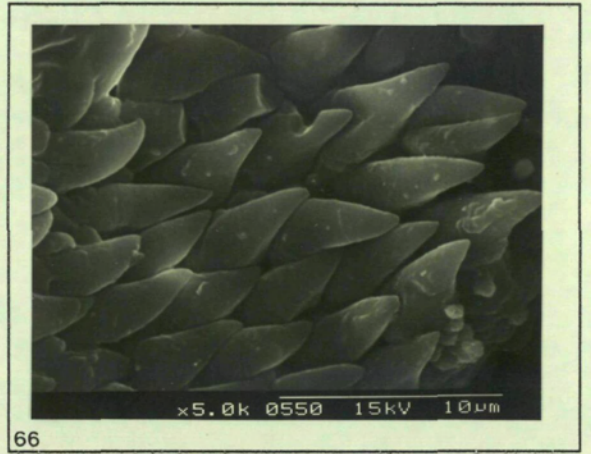
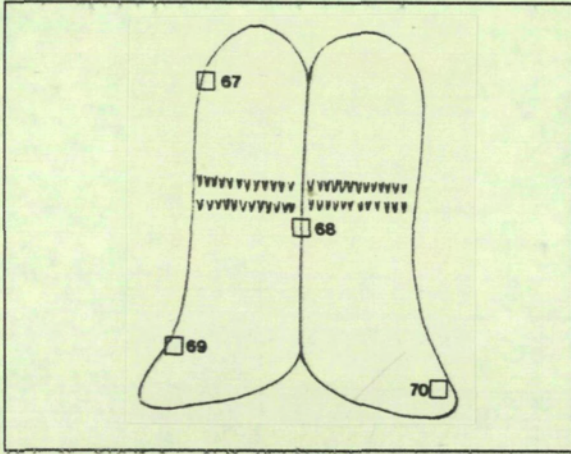
Se han observado un total de 4 rádulas y 4 armaduras labiales de ejemplares de Castellammare y 1 rádula y 1 armadura del ejemplar de Massa.

Las fórmulas radulares se detallan en la Tabla 5.35.

Número de filas	Número de dientes/fila	Procedencia
35	39-0-39	Castellammare
42	42-0-42	Castellammare
36	35-0-35	Castellammare
32	38-0-38	Massa Lubrense

Tabla 5.35. Fórmulas radulares de algunos de los ejemplares estudiados.

Hypselodoris sp



Los dientes presentaban 3 ó 4 dentículos, llegando a 5 en algunos casos. La morfología de los dientes en las distintas zonas de la rádula se puede ver en las fotografías (67 a 70). La armadura labial presenta uncinos simples y ocasionalmente dobles (fotografía 66).

5.6.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

El primer análisis fue cualitativo y se realizó extrayendo separadamente las MDFs y la glándula digestiva del resto del animal. Aparecieron longifolina y otros furanos en el extracto de las MDFs y trazas en el hepatopáncreas.

Los escasos resultados cuantitativos que se pudieron obtener de tan pocos animales, son los que se muestran en la Tabla 5.36.

Sección	Número de animales	peso seco	extracto acetónico
mucus	5	10	2.8
enteros	3	5.9	1.9
MDFs (n=12)	1	<0.1	3.2
glándula digestiva	1	<0.1	3.1
resto parte externa	1	<0.1	0.5
resto de vísceras	1	<0.1	0.2

Tabla 5.36. Análisis químico de los ejemplares de Castellammare (datos en mg).

La placa calibrada en éter de petróleo demostró que estos animales presentaban un patrón completamente distinto a los *H. fontandraui* de Sicilia. Presentaban abundante longifolina (rf 0.3, color azul), especialmente en los extractos de los 3 animales enteros, MDFs de un animal y trazas en los otros extractos. Debido a la poca cantidad sólo se observó otro furano

acompañante a r_f 0.6, en los dos extractos citados. Se hizo también una placa impregnada con AgNO_3 en heptano-benceno 1-1, con la cual se confirmó la presencia de longifolina y el otro furano mencionado (no identificado).

Como resumen se podría decir que se detectaron longifolina y otra (u otras) sustancia de naturaleza furánica en MDFs, glándula digestiva (en menor cantidad) y secreción mucosa, mientras que no se hallaron en el resto del animal.

Secreciones externas. Tras cuatro días en acuario, 5 animales se introdujeron en agua de mar con Cl_2Mg y se recogió el mucus blanco que secretaban. Este fue analizado químicamente y se observó mediante TLC que presentaba casi exclusivamente longifolina y otros furanos superiores. La muestra conservada para NMR no pudo ser analizada ya que se extravió en el laboratorio. De todas formas, en TLC se apreciaba la mayor presencia de furanos de r_f superior respecto a las otras especies.

Origen de los productos.

Los metabolitos hallados en nuestros ejemplares indican claramente una alimentación sobre esponjas de "tipo *Dysidea*" como en el resto de especies del género estudiadas (a excepción de *H. orsini*).

Se recogieron unos excrementos depositados al poco tiempo de ser capturados, pero al ser muy poca cantidad los posibles restos de espículas o fibras de la dieta no pudieron ser identificados.

Función.

La actividad de la longifolina ha sido ya comentada en el apartado 5.1.3.2. En cuanto a la otra sustancia furánica, la cantidad obtenida fue insuficiente para identificarla mediante NMR, y por lo tanto tampoco se pudieron hacer tests de actividad.

5.6.3.3. Resumen conclusivo.

Los estudios preliminares llevados a cabo con los ejemplares de *Hypselodoris* sp capturados indican una estrategia defensiva similar al resto de especies hasta ahora descritas, basada en la adquisición y acumulación en MDFs y secreción mucosa, de sustancias de naturaleza furánica posiblemente procedentes de esponjas.

5.7. *Hypselodoris orsini* (Vérany, 1846).

5.7.1. Introducción.

5.7.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

En muchas ocasiones esta especie ha sido confundida con *H. tricolor* y citada como tal en algunas referencias. Siguiendo con los criterios de Ortea y García (*en prensa*), consideramos que el nombre válido para esta especie debería ser el de Verany (1846).

Doris orsini.- Verany (1846).

Chromodoris orsini.- Ihering (1880).

Glossodoris coelestis.- Pruvot-Fol (1951, 1954); Sordi y Majidi (1957); Vicente (1967).

Glossodoris tricolor.- Haefelfinger (1969a y b); Margalef (1982); Ros (1975, 1978a y b); Ros y Altimira (1977).

Hypselodoris coelestis.- García (1983); Templado *et al.* (1983); Ballesteros (19805); Ballesteros *et al.* (1986a y b); Cervera *et al.* (1988).

Hypselodoris tricolor.- Vicente (1967); Pereira (1980); Cimino *et al.* (1982, 1991d); Cattaneo *et al.* (1990).

Hypselodoris orsini.- Avila y Durfort (1992); Cimino *et al.* (*en prensa*).

Las citas de Schmekel y Portmann (1982) para *H. tricolor* podrían corresponder en realidad a *H. orsini*, ya que si bien no citan esta especie, uno de los esquemas y la explicación del texto indican que se trata de esta especie.

5.7.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Presenta una línea media blanca en el dorso, que no sobrepasa los rinóforos por delante, y que por detrás acaba en la abertura branquial (pudiendo rodearla). El hiponoto presenta una línea blanca que rodea al orificio genital por debajo y forma una estría sobre la cola. En el dorso hay

numerosos tubérculos, pequeños y redondeados, distribuidos regularmente. Rinóforos y branquias azules sin pigmento amarillo. El borde del manto presenta una línea submarginal blanca que puede ser amarilla en los laterales de los ejemplares más grandes. Presenta de 4 a 6 hojas branquiales.

5.7.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

García (1984) indica que esta especie presenta entre 3 y 4 "acúmulos glandulares esféricos" en el borde posterior del manto.

García *et al.* (1991) estudiaron 34 ejemplares describiendo la presencia exclusivamente de MDFs posteriores, en número de 1 a 5 en ejemplares de 8-9 mm (de unas 400 μm de diámetro), y de 2 a 5 en ejemplares de 13-17 mm (de unas 500 μm), si bien no incluyeron fotografías ni descripción histológica de las mismas.

Ecológicas.

Ros cita para *H. tricolor* un régimen zoófago: micrófago: de esponjas, y como presas (como ya hemos comentado) menciona *Ircinia fasciculata* y *Cacospongia scalaris* (1978a). Tal y como se ha dicho en el capítulo de *H. tricolor*, estos datos deben ser incluidos aquí como referidos a *H. orsini*. El mismo autor indica que se halla en biocenosis de sustratos rocosos, y en hojas y rizomas de fanerógamas con epibiontes.

Otros casos similares, referentes a su alimentación se pueden ver en Fournier (1969) y Cattaneo *et al.* (1990), llamándole ambos *H. tricolor*.

Químicas.

Cimino *et al.* (1982) hallaron los compuestos furoscalarol y deoxoscalarina (en proporción 1:10) en el nudibranquio entero (como *H. tricolor*) y en la esponja *Cacospongia mollior*. Esta esponja además

presentaba scalaradial (ausente en el molusco). Sugirieron que el opistobranquio convertiría el scalaradial en deoxoscalarina. Ambos compuestos (furoscalarol y deoxoscalarina) presentaron actividad repelente para el pez *Carassius auratus* a 300 y 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente, con un efecto curioso: tras ingerir un fragmento de alimento tratado, los peces rechazaron la comida no tratada durante un período variable (de algunas horas a varios días).

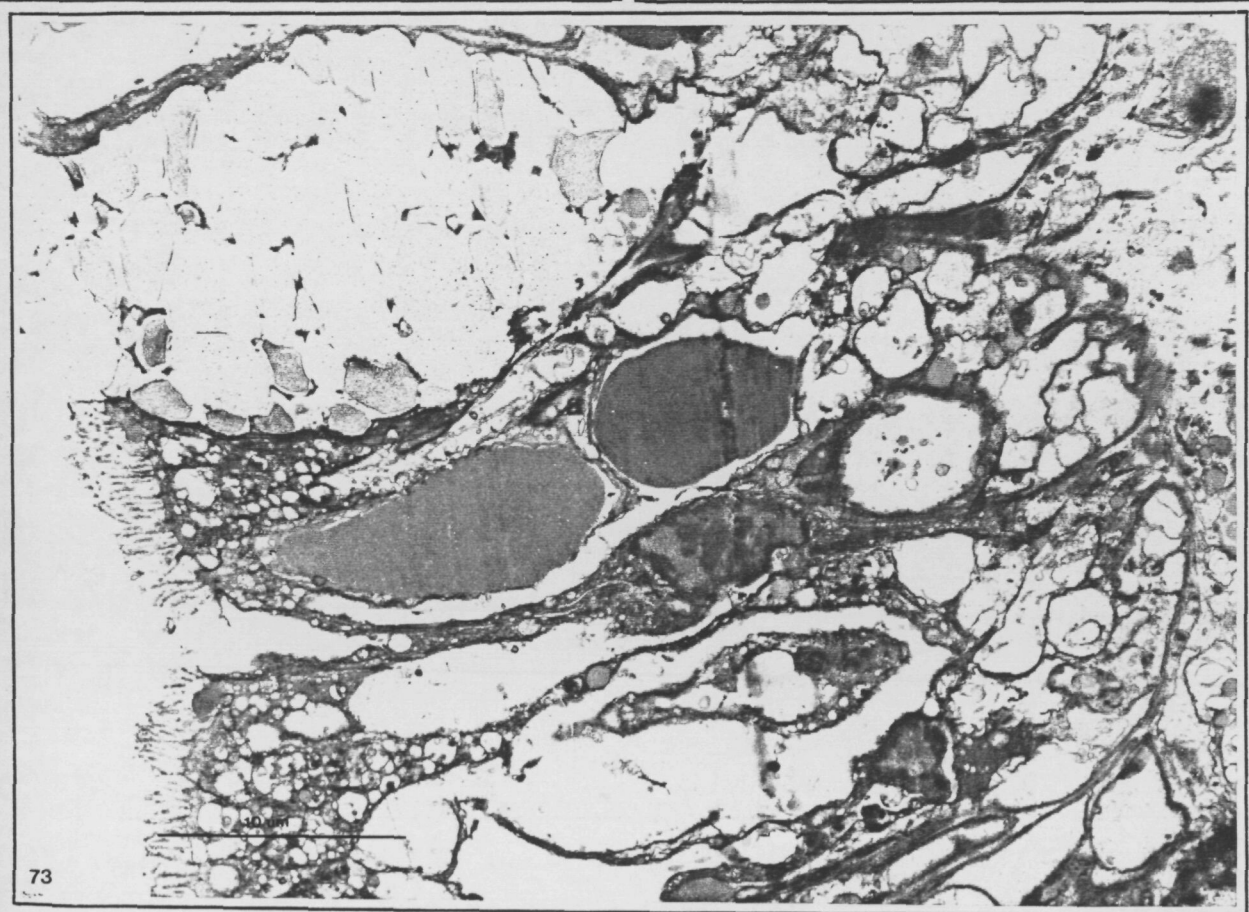
Cimino *et al.* (1991d) confirmaron estos resultados, hallando además un isómero de la deoxoscalarina, si bien no exponían datos respecto a número de ejemplares, miligramos de producto, etc. Esto ha sido posteriormente estudiado por Cimino *et al.* (*en prensa*), quienes han descrito el isómero como 6-oxo-deoxoscalarina.

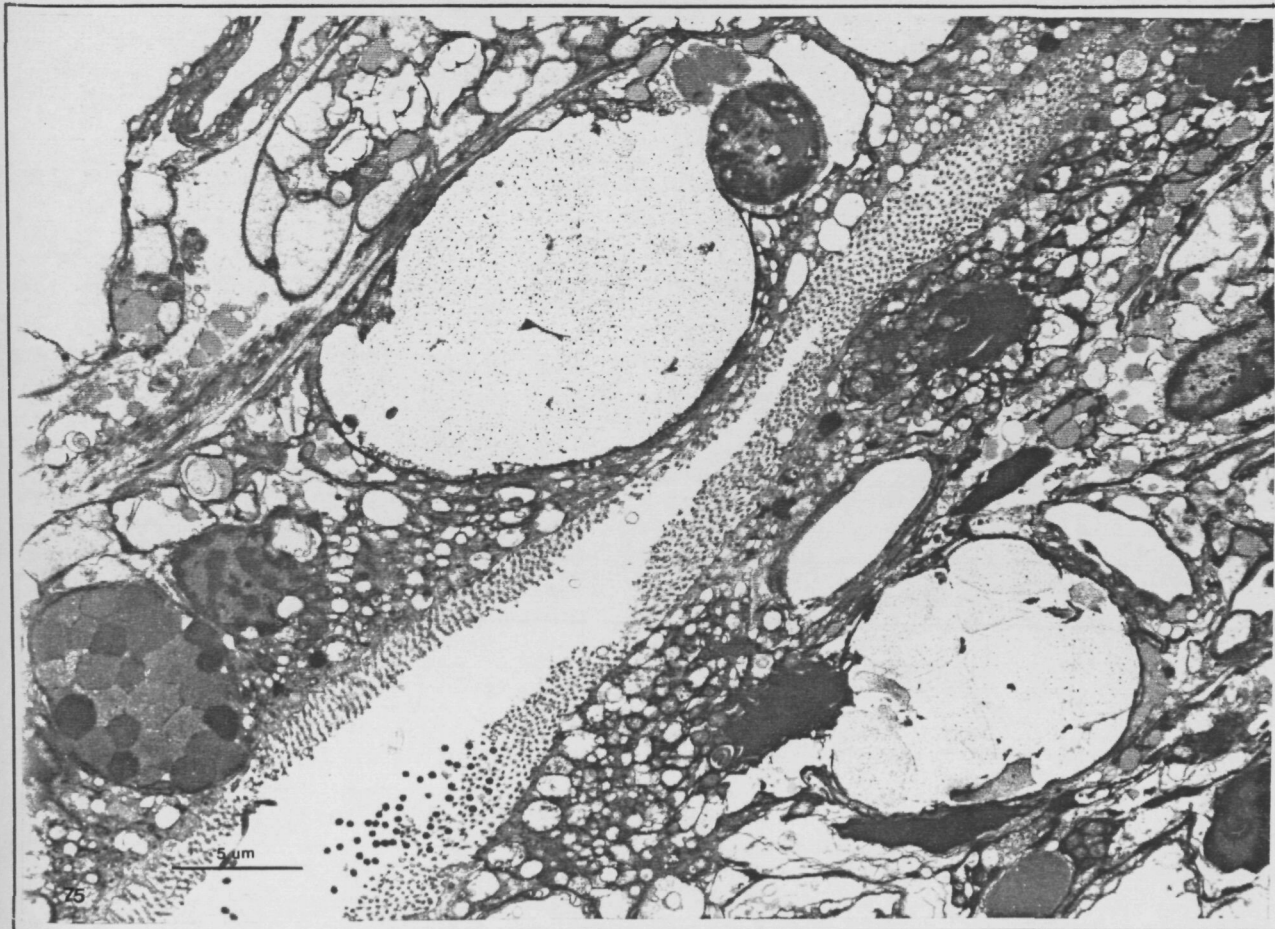
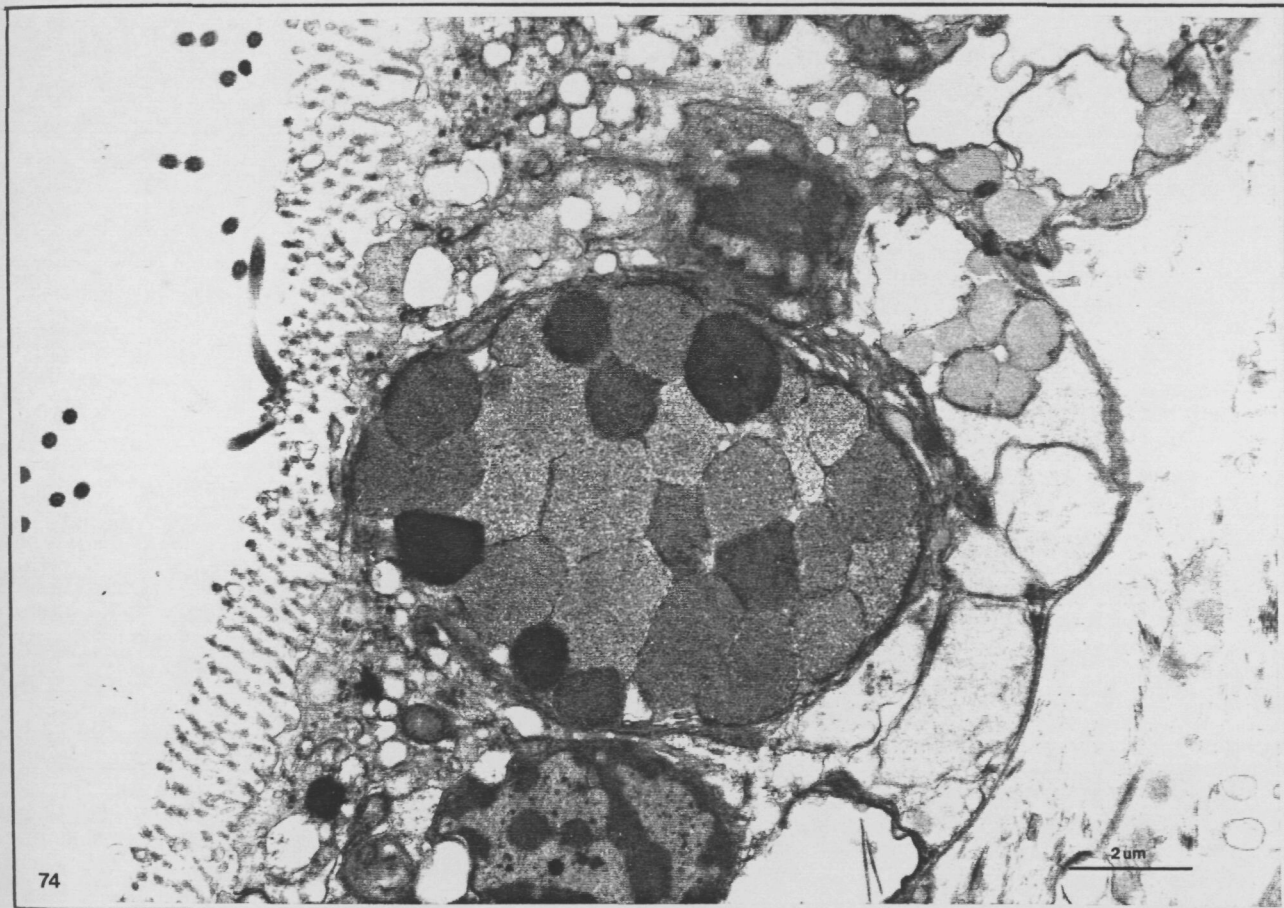
5.7.2. Material estudiado.

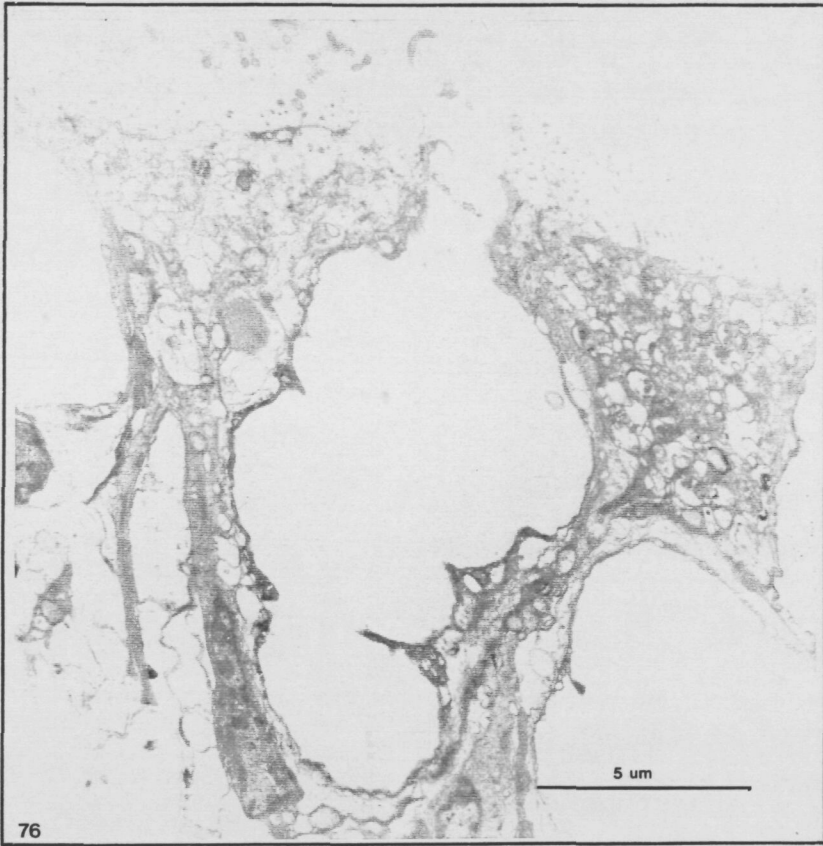
Los datos correspondientes a los ejemplares capturados se detallan en la Tabla 5.37.

LOCALIDAD	FECHA	NUMERO DE INDIVIDUOS
Blanes	25-1-91	1
Blanes	26-6-91	2
Cadaqués	25-7-91	1
varios*	Julio-91	12
Blanes	Julio-91	6
Blanes	2-8-91	1
	21-8-91	1
	10-9-91	1
Fiumicello (Maratea)	30-5-89	6
TOTAL		31
*= Es Caials (Cadaqués) y Sant Francesc (Blanes).		

Tabla 5.37. Datos de los ejemplares de *H. orsini* estudiados.







En las paredes de la Punta Santa Ana (Blanes) siempre se encuentra asociado a *Cacospongia mollior*, hallándose a -10 m de profundidad en zonas esciáfilas. Las paredes de Maratea eran muy parecidas a estas.

5.7.3. Resultados y discusión.

5.7.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Morfología externa.

El borde del manto es azul, a diferencia de las otras especies, y está flanqueado por una línea blanca o amarilla por encima y por debajo. La línea blanca medio-dorsal rodea la branquia sin continuar por detrás, y sin sobrepasar a los rinóforos por delante. La característica más típica quizá sean los pequeños tubérculos que se observan dorsalmente en el manto. Las líneas de color son siempre muy finas en esta especie.

Epitelio y formaciones dérmicas del manto.

Esta especie presenta solamente MDFs posteriores, cuyo número y situación coinciden con los descritos por García *et al.* (1991). Contamos 3 y 4 MDFs en un par de ejemplares de unos 10 mm cada uno.

En la fotografía 71 se observa un corte semifino al microscopio óptico. Se puede ver que aparecen agregados de células monovacuoladas (similares a las MDFs) con el núcleo periférico y la mayor parte del volúmen celular ocupado por una gran vacuola. En estas vacuolas no se destaca ninguna estructura, pudiendo ser los lugares de acumulación de sustancias de tipo lipídico. Se observa además una emigración de este tipo de células hacia el epitelio (señalado con flechas en la fotografía, así como las células caliciformes con un asterisco). Puede verse una marcada diferencia entre estos agregados celulares y las MDFs descritas en las especies estudiadas anteriormente, ya que en este caso no parece haber envoltura muscular y la forma es irregular.

Las fotografías 72 a 77 muestran algunas de las características del epitelio. El tipo predominante de células en la mucosa es, como en el resto de especies, el de las células vibrátiles. En este caso, el número de microvilli es, en mucho, superior al resto de especies estudiadas en esta Tesis. Como es habitual tienen el núcleo en una posición centro-basal. El polo apical se caracteriza por su aspecto extraordinariamente vacuolado, destacando las estructuras de tipo lisosómico y las formaciones de exocitosis. El polo apical externo recuerda mucho al borde en cepillo de los enterocitos de invertebrados y vertebrados, es decir al de las células de carácter absorbente. Los microvilli, casi todos de la misma altura forman una chapa (o borde en cepillo) consolidada por un glicocáliz bien desarrollado. Entre los microvilli aparece esporádicamente algún cilio. En una proporción de 1 a 10 aparecen voluminosas células caliciformes. En sus granos de secreción mucosa, como es habitual, se observan distintos grados de compactación, lo que les da una diferente electrodensidad. La liberación de estas células es individualizada, si bien en ocasiones parece haber una fusión previa antes de la secreción.

Ocasionalmente, los gránulos de secreción mucosa pueden hallarse en el polo apical de las células con microvilli, y en este caso la liberación se realizaría por exocitosis.

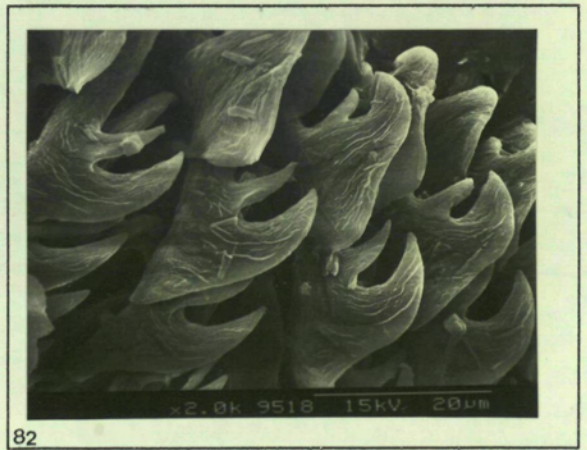
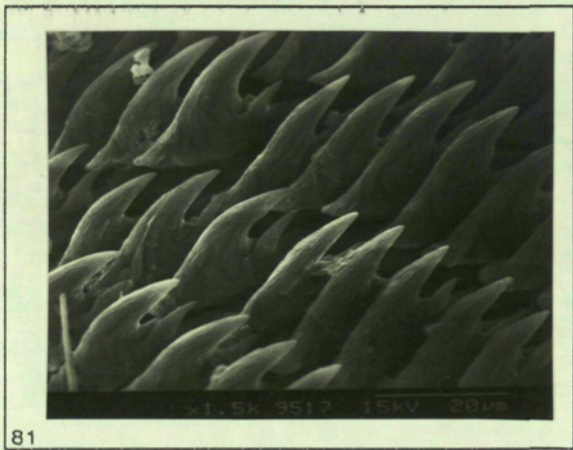
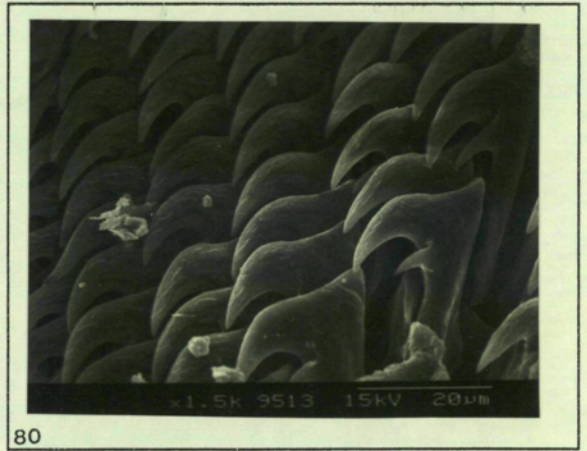
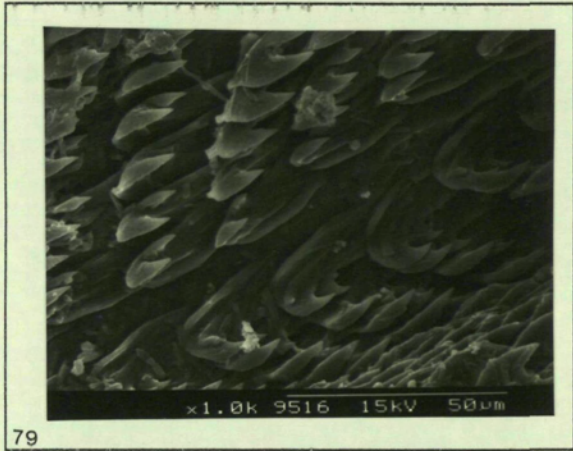
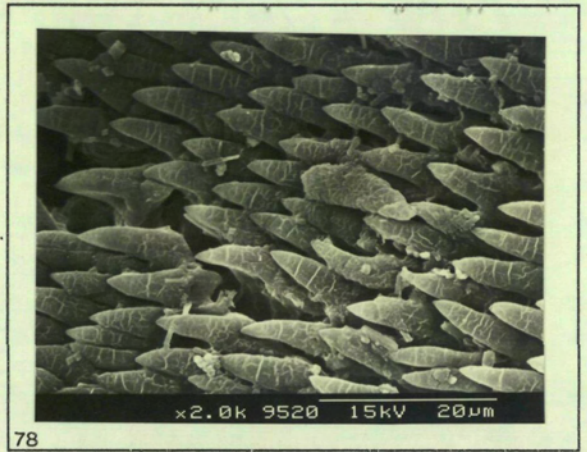
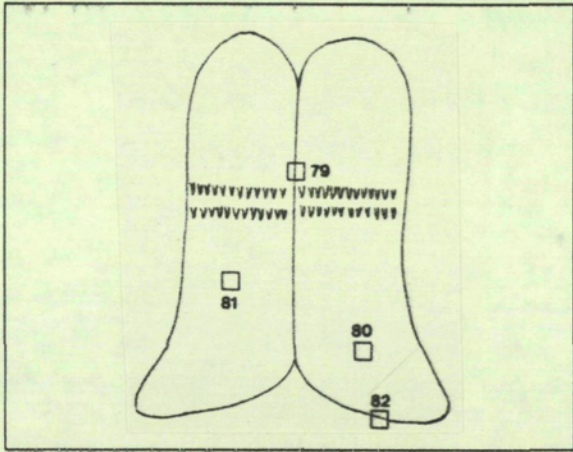
Rádula y armadura labial.

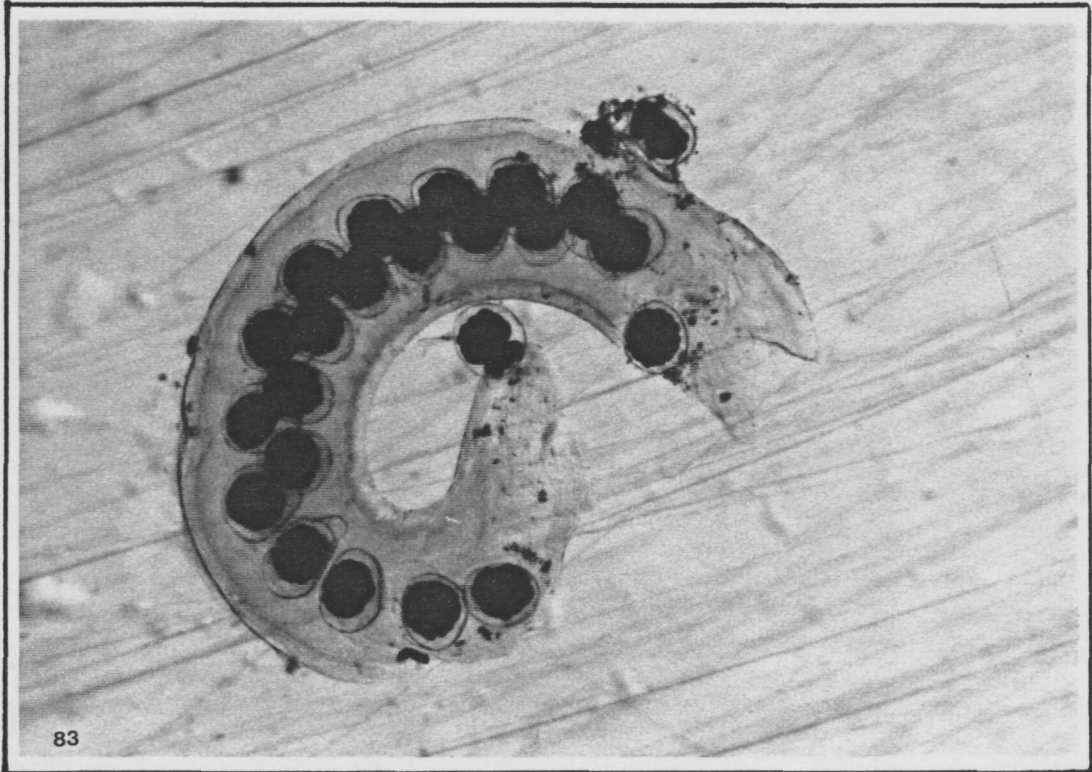
Se han estudiado 2 rádulas y 2 armaduras labiales de ejemplares procedentes de Blanes. Las fórmulas radulares se exponen en la Tabla 5.38.

Número de filas	Número de dientes/fila	Referencia
31	28-0-28	esta
40	28-0-28	esta
51	30-0-30	Ortea y García (<i>en prensa</i>)

Tabla 5.38. Fórmulas radulares de algunos ejemplares.

Hypselodoris orsini





Según Ortea y García (*en prensa*), la armadura no presenta uncinos bien desarrollados, son más bien como plaquetas bífidas. En nuestros ejemplares los uncinos de la armadura eran como los que muestra la fotografía 78, ocasionalmente bífidos. Los dientes de la rádula (fotografías 79 a 82) son bicúspides pero simples, es decir, sin denticulaciones, coincidiendo con Ortea y García (*op. cit.*).

Características de las puestas.

Al mantener algunos ejemplares vivos en acuario, observamos que realizaron varias puestas (8 en total), todas ellas sobre la esponja *Cacospongia mollior*. Las puestas, en forma de media luna, se caracterizan por tener pocos huevos de tamaño relativamente grande (ver fotografía 83). Ortea y García (*en prensa*) citan cápsulas de unas 400 μm de diámetro. El número de huevos medido en 6 de las puestas obtenidas fue de: 24, 11, 23, 23, 12 y 15. La media es de 18 huevos por puesta. Es de destacar el hecho de que los huevos se distribuyen en algunos casos en una sola fila, y a veces en dos. En una de las puestas de 23 huevos, estos se distribuían así: 12 en una fila, 8 en la siguiente y 3 aparentemente sin pertenecer a ninguna de las dos filas. En la puesta de 24 huevos había dos filas de 16 y 8 huevos cada una. El resto eran de una sola fila.

5.7.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

Del total de 23 animales, se disecaron 3 en las partes que se indican en la Tabla 5.39.

En los extractos del mucus y MDFs se observó en TLC un producto abundante bajo los esteroides, que correspondería al isómero de la deoxoscalarina. El patrón general era como el de los ejemplares italianos (Cimino *et al.*, *en prensa*). Se apreciaba que la supuesta deoxoscalarina

(identificada mediante comparación sobre placa) estaba presente en las vísceras de forma más abundante. Esto confirmaría la idea de que procede de la transformación del scalaradial. Se incluye en la Figura 5.15. la fórmula de la deoxoscalarina. Cimino *et al.* (*en prensa*) han demostrado que la deoxoscalarina no se halla en la esponja, sino solamente en el nudibranquio.

	peso seco	extracto etéreo
MDFs	<0.001 mg	-
vísceras	4.9 mg	0.2 mg
manto	4.0 mg	0.2 mg

Tabla 5.39. Análisis químico de 3 ejemplares.

De 20 animales (enteros) se obtuvo el extracto acetónico, 21.5 mg de peso seco y 4 mg de extracto etéreo. Se obtuvo también el extracto de la secreción mucosa. Se hicieron placas en comparación con scalaradial y con extractos de los ejemplares italianos (Cimino *et al.*, *en prensa*). Mediante TLC se confirmó la presencia de deoxoscalarina y su isómero. El scalaradial de la esponja no aparecía en los extractos de las vísceras ni en los de los animales enteros, por lo que se supone que se transforma muy rápidamente en el molusco. La deoxoscalarina se localizaría, siempre según TLC, en la glándula digestiva preferentemente, mientras que su isómero, junto a otro compuesto relacionado (de rf inferior) se localizaría preferentemente en las MDFs. En el mucus de los 20 ejemplares no se detectó nada de interés.

Como se puede ver en la Figura 5.15., estos compuestos son completamente distintos a los descritos para las especies anteriores de *Hypselodoris*, en relación también a una dieta muy diferente.

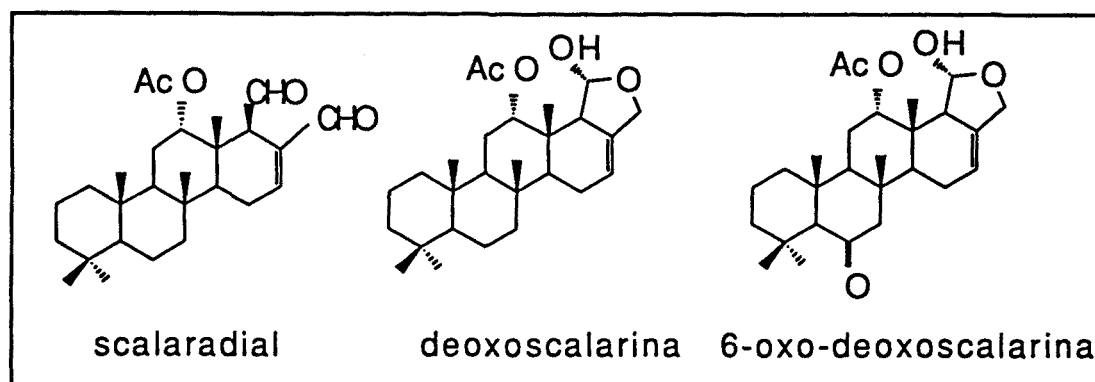


Figura 5.15. Fórmulas del scalaradial, deoxoscalarina y 6-oxo-deoxoscalarina.

Origen de los productos.

Los ejemplares de Blanes se alimentan de *Cacospongia mollior* Schmidt, 1862, hecho que se ha observado repetidamente en acuario y en el medio ambiente. Otras citas (como *H. tricolor*) incluyen en su dieta algunas especies de *Ircinia*, sin embargo esta relación podría confirmarse si presentase el molusco algún producto relacionado con ellas (ircininas, fasciculatinas, etc.), hecho que no se ha detectado en los ejemplares aquí analizados.

Para demostrar esta relación con la esponja *Cacospongia mollior* se realizaron tres experimentos de depredación sucesivos. En cada uno de ellos se utilizaron 4 ejemplares. En el primero de ellos se colocaba un ejemplar con dos fragmentos de esponjas (*Pleraplysilla spinifera/Dysidea fragilis*, *Dysidea avara/Anchinoe fictitius*, *P. spinifera/Cacospongia mollior*, *D. avara/Clathrina coriacea*). El primer ejemplar estuvo apenas 5 minutos sobre *P. spinifera*, y luego en movimiento por el recipiente durante las 6 horas de duración del experimento. El segundo ejemplar estuvo constantemente en movimiento. El tercero a los 30 minutos se paró sobre *C. mollior*, de la que ya no se movió y sobre la que se le vió comer. El cuarto ejemplar estuvo en

movimiento hasta los 30 minutos, en que se paró sobre *D. avara*, y luego siguió en movimiento.

En el segundo experimento dos ejemplares se colocaron en sendos recipientes con *C. mollior*/*P. spinifera*, y otros dos con *C. mollior*/*D. avara*. El primer ejemplar estuvo en movimiento durante la primera hora, y posteriormente se paró sobre *C. mollior*, viéndosele comer. El segundo y el cuarto ejemplar se pasaron las 2 horas y media de este experimento en movimiento. El tercer ejemplar se situó a los 5 minutos sobre *C. mollior* y luego estuvo en movimiento hasta el final del experimento.

En el tercer experimento tres ejemplares se colocaron con *D. avara*/*C. mollior*, y el cuarto con *C. mollior*/*P. spinifera*. Los cuatro ejemplares se pasaron de 1 a 5 horas (de las 6 de duración del experimento) sobre *C. mollior*, y se les vió comer activamente. Como conclusión parece claro que esta especie mantiene una estrecha relación de depredación con la esponja *C. mollior*.

Función.

Ya hemos comentado en el apartado 5.7.1.3. la actividad repelente descrita por Cimino *et al.* (1982) para algunos de estos compuestos. Para comprobar su actividad con otros organismos, se realizaron algunos experimentos con posibles depredadores: el pez *Trypterygion tripteronotus*, una anémona (*Aiptasia mutabilis*), la planaria *Prosteceraeus roseus* y los opistobranquios *Pleurobranchaea meckeli* y *Aglaja tricolorata*.

El pez *T. tripteronotus*, mantenido sin alimentos durante dos semanas, escupió dos veces sucesivas un ejemplar, sin comérselo, a pesar de que el ejemplar estaba muerto (en buen estado). La anémona, al darle dos ejemplares junto con otras presas al azar, no los acercó a su boca con los tentáculos, y ambos ejemplares escaparon. *Prosteceraeus roseus* no atacó a ninguno de los 3 ejemplares pequeños (cuatro veces más pequeños que la planaria), aunque se les hizo entrar en contacto en repetidas ocasiones durante las 3 horas que duró el experimento.

Pleurobranchaea meckeli, mantenida sin alimento durante varios días, no atacó a los 3 ejemplares durante las 4 horas y media de duración del experimento. Se repitió el experimento a los dos días y el resultado fue idéntico, observándose en una ocasión como se lo acercaba a la boca y tras tocarlo se alejó en otra dirección. Tal vez un efecto combinado de tamaño, color y "sabor" sea el factor causante de su repelencia. *Aglaja tricolorata*, especie de la que se contaba con dos ejemplares, rechazó asimismo dos ejemplares de *H. orsini*, utilizados junto a otras presas ofrecidas al azar. Así pues, no se han hallado depredadores capaces de alimentarse de esta especie.

5.7.3.3. Resumen conclusivo.

H. orsini utiliza una estrategia defensiva basada en compuestos derivados del scalaradial, compuesto procedente de la esponja *Cacospongia mollior*, que acumula preferentemente en MDFs y glándula digestiva. Estos metabolitos, que podrían formarse debido a un proceso de detoxificación, son completamente distintos a los mencionados hasta ahora para las demás especies de *Hypselodoris*.

5.8. *Chromodoris luteorosea* (Rapp, 1827).

5.8.1. Introducción.

5.8.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Doris luteorosea.- Rapp (1827); Cantraine (1841).

Chromodoris iheringi.- Bergh (1872).

Glossodoris luteorosea.- Vicente (1964, 1967); Ros (1975 y 1978a); Ortea (1977); Ros y Altimira (1977); Altimira *et al.* (1981).

Chromodoris luteorosea.- Vayssière (1901, 1913); Pruvot-Fol (1954); Haefelfinger (1960, 1969a y b); Schmekel (1968b); Bouchet y Tardy (1976); Edmunds (1981); Pereira (1980); Templado (1982, 1983, 1984); García (1983); Huelín y Ros (1984); Ballesteros (1980); Cervera y García (1986); Ortea y Valdés (1991).

5.8.1.2. Breve descripción y características de la especie.

C. luteorosea se encuentra descrita con detalle en Schmekel y Portmann (1982) y Ortea y Valdés (1991). Como breve definición de la especie se puede decir lo siguiente: coloración general del cuerpo rosa violáceo. Sobre el dorso hay un número variable de manchas grandes amarillas, de forma circular u ovalada, de borde entero y orladas de blanco y violeta intenso. Manto bordeado por una línea amarilla, en el interior de la cual se dispone otra blanca más delgada. Cola rosa violáceo rodeada por una fina línea blanca y con algunas manchas. Rinóforos cónicos, violeta intenso, con el ápice blanco y con un ligero punteado blanco en algunos ejemplares. De 8 a 10 branquias unipinnadas con el raquis violeta y el ápice blanco, dispuestas en círculo alrededor del ano.

5.8.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

García *et al.*, (1991) analizaron la estructura microscópica de las MDFs de varias especies de la Familia Chromodorididae. Estudiaron 5 ejemplares de *C. luteorosea*, y localizaron las MDFs alrededor de todo el manto, excepto en frente de los rinóforos, formando bandas radiales. Según este mismo estudio, las células vacuolares presentan un diámetro de 30-40 μm , aunque no se incluía ninguna fotografía de las mismas, sino solamente un esquema de su localización en el cuerpo del animal. Las pruebas histoquímicas realizadas demostraron que dichas células vacuolares no contenían mucosubstancias ni proteínas, sino que se teñían con azul de toluidina cuando eran post-fijadas con tetraóxido de osmio. Las células de la envoltura exterior, en cambio, sí contenían mucosubstancias neutras.

Ecológicas.

En Schmekel y Portmann (1982) se afirma que esta especie se alimenta de la esponja *Spongionella*. Cimino *et al.* (1990b) discuten también la posibilidad de que se alimente de alguna especie de *Spongionella* por las características de las sustancias químicas que presentan.

Ros (1978a) señaló que esta especie se alimenta de esponjas pero no detallaba la especie. La incluyó en su clasificación por regímenes alimentarios en el grupo de los zoófagos: micrófagos (ramoneadores, suctores): de esponjas. En cuanto a su habitat, la citaba en biocenosis de praderas de fanerógamas y de substratos duros. Cattaneo *et al.* (1990) mencionaron su presencia en biocenosis coralígenas, entre 5 y 60 m, bajo piedras con *Aplysilla rosea*, de la que según estos autores se alimenta.

Químicas.

Cimino *et al.*, (1990b), en ejemplares del Sudoeste italiano, hallaron luteorosina, 12-*epi*-aplysillina, 12-*epi*-12-deacetyl-aplysillina y macfarlandina A. El primero de los productos citados fue hallado muy tóxico (a 10 µg/ml), mientras que los otros tres eran tóxicos, a la misma concentración, para *Gambusia affinis*.

5.8.2. Material estudiado.

Los datos del material se detallan en la Tabla 5.40.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Taranto	11-10-88	11	-6 m	quím+rád
Las Llanas	Dic 89	50	-2 a -7 m	quím+rád
Zumaia	13-4-91	1	IT	exp
Pechón	17-4-91	1	IT	exp
TOTAL		63		

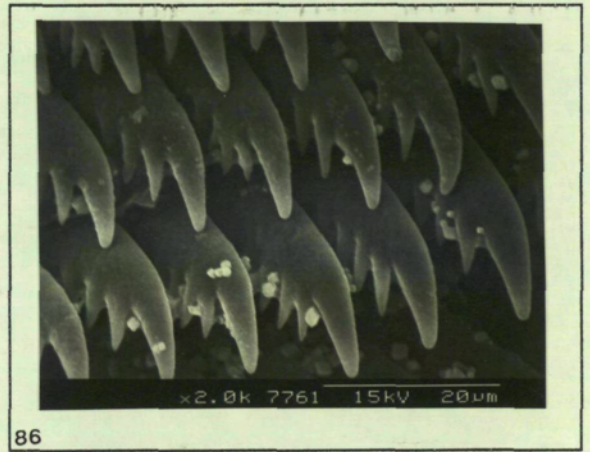
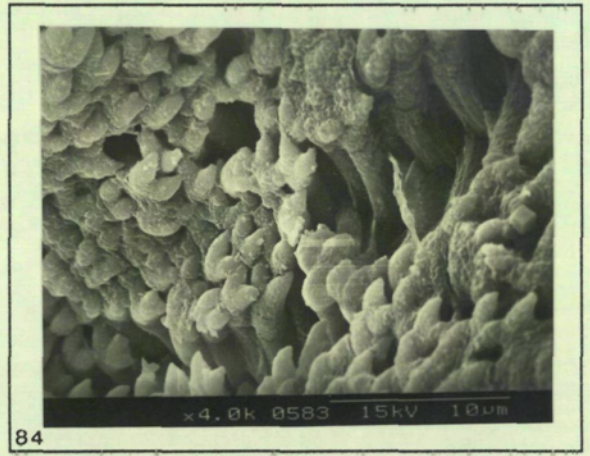
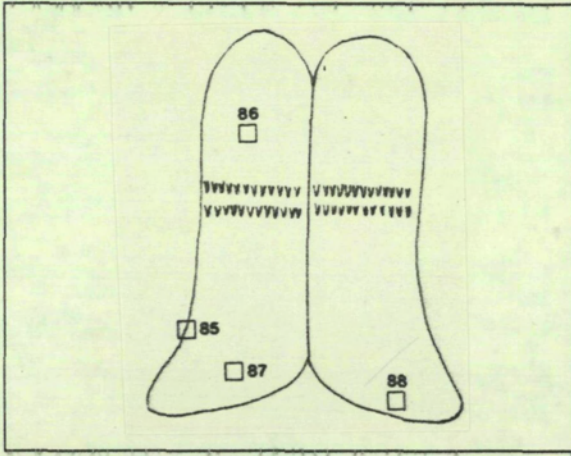
(1) Número de individuos.
(2) Hábitat o profundidad. IT= Intermareal rocoso.
(3) Utilización del material (rád= rádula, quím= química, exp= experimentos).

Tabla 5.40. Datos de los ejemplares capturados.

Los animales recolectados en Taranto (11-X-88) hicieron una puesta en acuario. Los animales de Zumaia y Pechón se mantuvieron vivos en acuario para medir su pH. Ambos fueron congelados tras realizar experimentos de predación con esponjas y ser fotografiados.

Los ejemplares capturados procedían de intermareales rocosos y de biocenosis de substratos duros mayoritariamente esciáfilos.

Chromodoris luteorosea



5.8.3. Resultados y discusión.

5.8.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Morfología externa.

Las manchas del manto presentan una banda exterior rosa oscuro, una banda blanca contigua y el interior amarillo, como el borde, coincidiendo con la descripción anterior. Sin embargo, se observó que el patrón de manchas dorsales es distinto según el lugar de procedencia (más regulares, por ejemplo, en los ejemplares de Taranto), así como la amplitud de la línea amarilla que bordea el manto (más estrecha en los ejemplares del Cantábrico).

Formaciones dérmicas del manto.

La situación de las MDFs en nuestros animales coincide con la descripción de García *et al.* (1991), excepto que en algunos ejemplares si pueden hallarse las MDFs en la zona anterior a los rinóforos, aunque no muy anteriores a ellos.

Rádula y armadura labial.

Se estudiaron las rádulas de varios ejemplares procedentes de Taranto y Las Llanas. No se observaron diferencias sustanciales entre las rádulas de los ejemplares de las distintas localidades. Las fotografías 84 a 88 muestran los detalles de los dientes de la rádula, que presentan dentículos a modo de peines, en número hasta 12, y de la armadura labial, que presenta uncinos bifurcados en su parte más distal. La Tabla 5.41. incluye las fórmulas radulares.

LOCALIDAD	(1)	(2)	TAMAÑO	REFERENCIA
Taranto	33	32-R-32	1.2	esta
Asturias	35	28-R-28	0.9	Ortea y Valdés (1991)
	48	46-R-46	3.1	idem
(1)= Número de filas.				
(2)= Número de dientes por fila.				

Tabla 5.41. Fórmulas radulares de algunos ejemplares de *C. luteorosea* (tamaño en cm).

5.8.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplares de Taranto. Para localizar los productos descritos por Cimino *et al.* (1990b) en los ejemplares italianos, un animal (0.9 cm) fue seccionado en partes. Además de localizar los productos, se pretendía ver: a) si en las branquias se localizaba algún producto (García, com. pers., indicó que era una zona glandular), b) si en el borde amarillo del manto se concentraba alguna de las sustancias descritas o no, y c) si era posible también separar las manchas dorsales. Las secciones hechas fueron: borde amarillo del manto; branquias; manchas dorsales amarillas del manto; hepatopáncreas; aparato digestivo; reproductor y sistema nervioso; y resto del manto y pie.

Las distintas secciones fueron extraídas con acetona y se obtuvieron posteriormente los extractos etéreos. Se realizaron placas (en éter de petróleo-éter etílico 1-1) a diferentes concentraciones. La única mancha fluorescente (rf=0.7, equivalente a la mezcla de luteorosina y macfarlandina A) se localizaba solamente en el borde del manto, junto con otros productos Ehrlich positivos. En los extractos 2 a 5 sólo había esteroides. En el hepatopáncreas había unas manchas poco evidentes igual que en el resto del manto y pie, bajo esteroides (rf=0.2 y 0.3). Hay una levísima fluorescencia en el resto del manto y del pie posiblemente por contaminación, al igual que las

manchas bajo esteroides en el borde amarillo del manto. Por tratarse de una valoración cualitativa con un sólo ejemplar, no se pesaron los extractos. Se repitió el mismo análisis con otros ejemplares, confirmándose la presencia de los productos fluorescentes en el borde del manto y también en el hepatopáncreas, no estando presentes más que trazas en el resto de extractos, incluyendo el extracto de las manchas amarillas del dorso.

Se extrajo una muestra del modo ya descrito y tras un análisis mediante TLC no se observaron productos de interés (en éter de petróleo-éter etílico 1-1) con ninguno de los reveladores habituales.

Fue extraída posteriormente otra muestra obtenida en acuario. Se observó una mancha fluorescente (con el mismo solvente citado arriba) que no era la mezcla luteosina/macfarlandina A, al estar situada a una altura inferior a ella en la placa. Se observaron asimismo esteroides. Se repitió la placa (en éter de petróleo:éter etílico 9-1) para ver mejor las manchas, y se confirmó lo anteriormente dicho. La escasez de producto no permitió realizar más análisis.

Ejemplares de Asturias. De los 50 animales se seccionó un primer ejemplar para localizar los posibles productos de interés, comparándolos en la placa con el extracto de *Spongionella gracilis* (supuesta presa de *C. luteorosea*). Se observaron (en éste y otros tres ejemplares) varias sustancias interesantes (posteriormente identificadas) localizadas como indica la Tabla 5.42., ninguna de ellas como las descritas para *S. gracilis* (Mayol *et al.*, 1986).

El primer ejemplar asturiano, de 1.2 cm, fue disecado en las siguientes partes: borde del manto, resto del manto y pie, branquias, glándula digestiva, y resto de vísceras. Se extrajeron según la metodología habitual. Se hicieron placas (éter de petróleo-éter etílico 1-1, y benceno-éter etílico 7-3, reveladas con Ehrlich y Sulfato de cerio), en las que se observaba claramente que las tres manchas descritas con anterioridad se localizaban con mucha mayor abundancia en el borde del manto. Para confirmarlo se realizaron otras placas calibradas y con los productos de referencia. En la glándula digestiva aparecieron también trazas de estos productos. En la Tabla 5.42. se indica la

localización de los productos en el organismo, obtenida tras el estudio de cuatro ejemplares.

Compuesto	borde del manto	pie y resto del manto	branquias	glándula digestiva
macfarlandina A +	+++	+	-	+
luteorosina				
polyrhaphina C +	+++	trazas	-	+
norrisolide				
chelonaplysina C	+++	trazas	-	+
esteroles	+	++	+	++
+++ = Abundante; ++ = Significativo; + = Escaso; - = Ausente.				

Tabla 5.42. Localización en el organismo de los compuestos hallados en *C. luteorosea* de Asturias.

Se obtuvo el extracto etéreo de los 50 animales asturianos (los primeros seccionados y el resto enteros) y éste pesaba 124 mg. En placa en éter de petróleo-éter etílico 4-6 se observaron tres manchas a $rf=0.5$, 0.3 y 0.28 respectivamente. Mediante columna cromatográfica fueron separados 4 mg correspondientes a la primera mancha, que resultó ser una mezcla de macfarlandina A y luteorosina, tal y como se confirmó tras su purificación en HPLC, separándose 1 mg del primer producto y 1 mg del segundo. Ambos productos fueron posteriormente identificados por su espectro NMR (por comparación con Cimino *et al.*, 1990b). La segunda mancha (9 mg) tras columna cromatográfica (en éter de petróleo-éter etílico 7-3), resultó estar formada por dos productos: polyrhaphina C (1 mg) y norrisolide (3 mg), que fueron a su vez identificados por comparación con los datos espectrales expuestos en la bibliografía (Bobzin y Faulkner, 1989a; Hochlowski *et al.*, 1983a). La tercera mancha (12 mg) se purificó mediante una placa preparativa (en benceno-éter etílico 7-3), obteniéndose 9 mg de la recientemente descrita chelonaplysina C (Bobzin y Faulkner, 1991), cuyos datos espectrales se exponen en el anexo 10.I.

Secreciones externas y pH. El pH externo medido en ejemplares vivos de Zumaia y Pechón resultó ser neutro (7).

Discusión química.

Los resultados cualitativos se resumen en la Tabla 5.43., en la que además se exponen, en comparación, los productos que presenta esta especie en las localidades analizadas.

Ejemplares italianos (Cimino et al., 1990b)	Ejemplares asturianos
macfarlandina A	macfarlandina A
luteorosina	luteorosina
12- <i>epi</i> -aplysillina	polyrhaphina C
12- <i>epi</i> -12-deacetyl-aplysillina	norrisolide
	chelonaplysina C

Tabla 5.43. Comparación entre ejemplares italianos y asturianos de *C. luteorosea*.

Se incluyen a continuación (Figura 5.16.) las fórmulas de los compuestos citados en la Tabla 5.43.

La macfarlandina A fue descrita previamente en *Chromodoris macfarlandi* (Molinski y Faulkner, 1986), mientras que luteorosina, 12-*epi*-aplysillina y 12-*epi*-12-deacetyl-aplysillina fueron halladas en *C. luteorosea* (Cimino et al., 1990b). La aplysillina se describió en la esponja *Aplysilla rosea* (Kazlauskas et al., 1979).

La polyrhaphina C se describió en la esponja *Aplysilla polyrhaphis* (Bobzin y Faulkner, 1989a), y el norrisolide en *Chromodoris norrisi* (Hochlowski et al., 1983a) y en las esponjas *Dendrilla* sp (Sullivan y Faulkner, 1984), *Aplysilla polyrhaphis* (Bobzin y Faulkner, 1989a), *Dysidea* sp (Rudi y Kashman, 1990), y *Chelonaplysilla* sp (Bobzin y Faulkner, 1991).

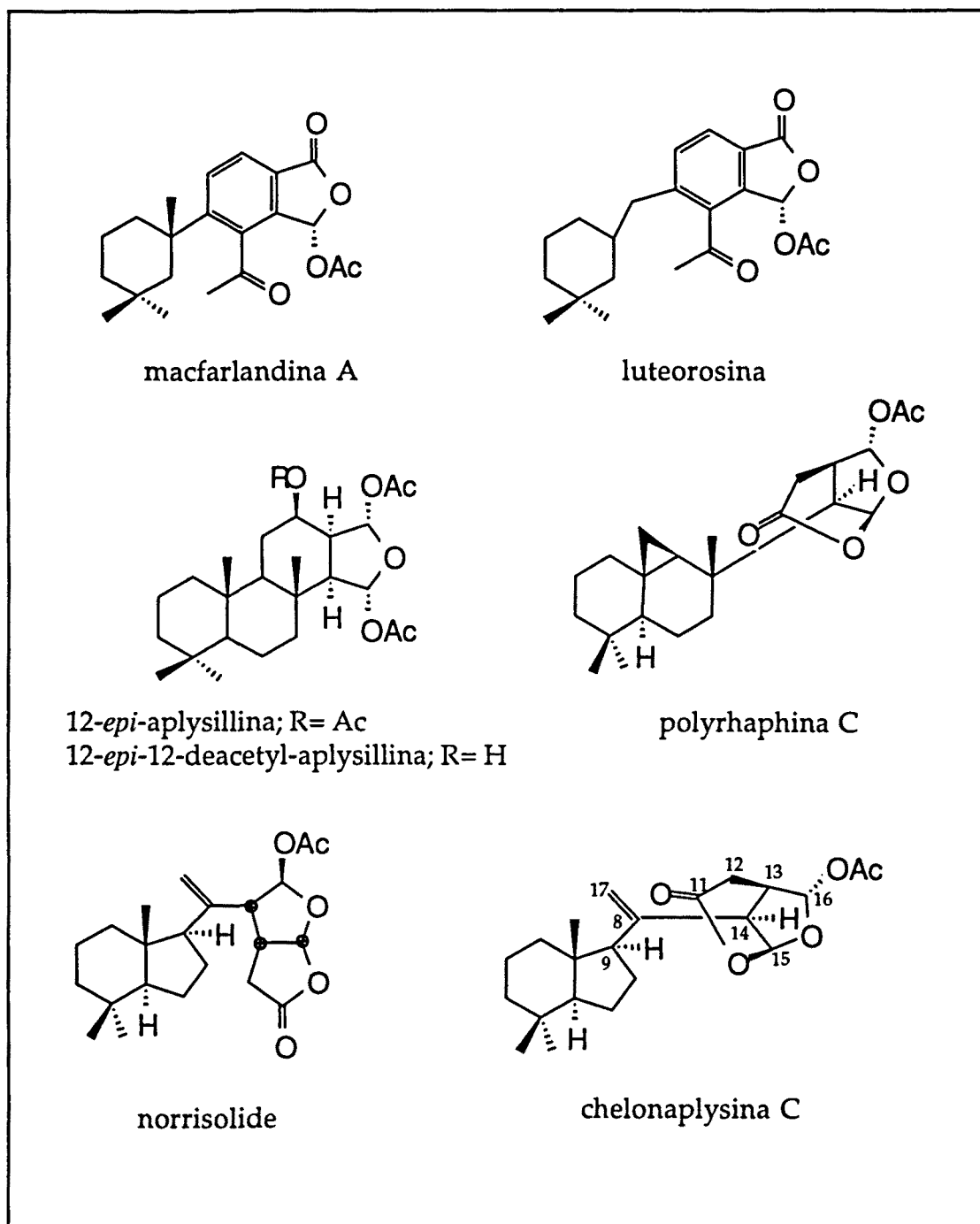


Figura 5.16. Fórmulas de los compuestos descritos en *C. luteorosea*.

La chelonaplysina C se halló recientemente en la esponja del Pacífico *Chelonaplysilla* sp (Bobzin y Faulkner, 1991). Sus datos espectrales se exponen en el anexo 10.I., así como en Gavagnin *et al.* (1992).

Origen de los productos.

Los productos presentes en esta especie proceden, por su estructura, seguramente de alguna esponja o varias esponjas. Las sustancias halladas son similares, aunque distintas de las descritas en la única especie de *Spongionella* estudiada hasta el momento en el Mediterráneo (*S. gracilis*, Mayol *et al.*, 1986). Sin embargo, como hemos mencionado en el apartado anterior, estos compuestos (o similares) han sido descritos en esponjas de otros lugares, como *Dendrilla*, *Dysidea*, *Aplysilla* y *Chelonaplysilla* (todas ellas pertenecientes al Orden Dendroceratida).

En la Figura 5.17. se puede observar la fórmula de la aplysillina, descrita en la esponja *Aplysilla rosea* por Kazlauskas *et al.* (1979), muy similar a los compuestos presentes en *C. luteorosea* italianos.

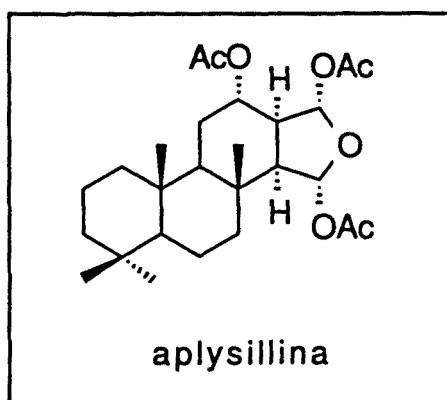


Figura 5.17. Fórmula de la aplysillina, compuesto relacionado estructuralmente con las sustancias de *C. luteorosea*.

Todo ello hace suponer un origen dietético a partir de esponjas no identificadas similares a las mencionadas.

Por otro lado, se mantuvieron vivos en acuario los ejemplares capturados en Zumaia y Pechón, y se realizaron con ellos algunos experimentos de predación con esponjas de Blanes: *Cacospongia mollior*/ *Siphonochalina coriacea* y *Dysidea avara*/ *Pleraplysilla spinifera*. Se utilizaron dos ejemplares de *C. luteorosea*. Ninguna de las esponjas pareció ser la presa de los moluscos, que no se detuvieron sobre ellas en las 6 horas que duró el experimento. Un segundo experimento, de 2 horas y media de duración, con las esponjas *Dysidea avara*/ *Hippospongia communis* y *Clathrina coriacea*/ *Siphonochalina coriacea* dió, análogamente, resultado negativo.

Función.

En la Tabla 5.44. se resumen las actividades ictiotóxicas, para *Gambusia affinis*, de los compuestos hallados en *C. luteorosea*.

COMPUESTO	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml
Luteorosina*	MT	I	I
12-epi-aplysillina*	T	I	I
12-epi-12-deacetylaplysillina*	T	I	I
Macfarlandina A*	T	I	I
Polyrhaphina C	T	I	NP
Norrisolide	T	I	NP
Chelonaplysina C	T	I	NP

MT= muy tóxico; T= tóxico; I= inactivo; NP= no probado; *= datos de Cimino et al. (1990b).

Tabla 5.44. Ictiotoxicidad para *Gambusia affinis*.

Así pues, todos los diterpenoides citados en la especie, tanto de los ejemplares italianos como de los asturianos, resultaron ser tóxicos para *Gambusia affinis*, a 10 ppm.

5.8.3.3. Resumen conclusivo.

C. luteorosea presenta una serie de compuestos diterpenoides (distintos según su localidad de procedencia), localizados preferentemente en el borde del manto (donde se hallan las MDFs) y hepatopáncreas, que proceden seguramente de esponjas relacionadas con *Aplysilla*, *Chelonaplysilla*, *Spongionella*, etc., y que probablemente el nudibranquio utiliza para su defensa.

C. luteorosea de Asturias presenta macfarlandina A, luteorosina, polyrhaphina C, norrisolide y chelonaplysina C. La distribución en el organismo de estos productos es la misma en ejemplares del Mediterráneo y del Cantábrico. Puede observarse que estos compuestos, con 20 átomos de Carbono, son distintos de los descritos hasta ahora para *Hypselodoris* spp (con 15 átomos de Carbono, excepto *H. orsini* con 25), aunque varias de estas especies comparten el mismo hábitat.

5.9. *Chromodoris purpurea* (Laurillard, 1831).

5.9.1. Introducción.

5.9.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio.

Doris purpurea.- Laurillard (1831).

Doris albescens.- Philippi (1844).

Chromodoris albescens.- Ihering (1880); Oliveira (1895); Nobre (1932).

Glossodoris purpurea.- Pruvot-Fol (1951, 1953 y 1954); Haefelfinger (1960); Vicente (1967); Schmekel (1968b); Ros (1975, 1985); Ortea (1977); Altimira *et al.* (1981).

Chromodoris purpurea.- Vérany (1846); Bouchet y Tardy (1976); Templado (1982, 1983 y 1984); García (1983); Luque (1983 y 1986); Ortea y Pérez (1983); Urgorri y Besteiro (1983); Huelín y Ros (1984); Ballesteros (1980); Ros y Gili (1985); Ballesteros *et al.* (1986b); Cervera y García (1986); Dekker (1986); Salas y Luque (1986); Otero y Trigo (1987); Marín y Ros (1987).

5.9.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Se puede hallar una descripción detallada en Schmekel y Portmann (1982) y Ortea y Pérez (1983). Se podrían resumir las características principales del siguiente modo: Coloración general violeta-lila claro, con branquias y rinóforos violeta oscuro con el extremo blanco. Manto liso con el borde amarillo-anaranjado. Cuerpo liso y aplanado. Rinóforos con 15-30 láminas. Tentáculos orales digitiformes. Branquias unipinnadas con un número de hojas branquiales de 9 a 17.

5.9.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

García *et al.*, (1991) estudiaron las MDFs de 8 especímenes (los más pequeños de 10-13 mm). Según estos autores las MDFs se localizan por todo el borde del manto, incluso en la zona situada delante de los rinóforos, tienen forma redondeada, y contienen células vacuolares esféricas bastante uniformes, de un diámetro de 20 μm (aunque a veces son ovaladas y miden 30-40 μm). En dicho trabajo se incluyeron fotografías de cortes semifinos. El área central no presenta células vacuolares. La descripción de las características histológicas e histoquímicas, según los citados autores, es la misma que se ha citado para *C. luteorosea*.

Ecológicas.

Schmekel (1968b) citaba *Spongionella pulchella* como su presa en el Mediterráneo. Ros (1978a) citó como alimento de *C. purpurea* alguna esponja pero sin detallar la especie. La describió como zoófago: micrófago (ramoneadores, suctores): de esponjas. Ortea y Pérez (1983) mencionaron la esponja *Aplysilla sulphurea* como su presa en el Cantábrico.

En cuanto al habitat, Ros (1978a) la citó en biocenosis de substratos duros (concretamente en precoralígeno y coralígeno), y en cuevas oscuras.

Las puestas y embriones se describieron en Ortea y Pérez (1983), destacando el hecho de que los juveniles se hallaron de forma abundante sobre *Aplysilla sulphurea*.

5.9.2. **Material estudiado.**

Se detallan los datos en la Tabla 5.45. Los ejemplares de Zumaia y St. Jean de Luz se mantuvieron vivos en acuario para medir el pH, y posteriormente fueron congelados. Los ejemplares sicilianos se hallaron en

substrato rocoso esciáfilo, medían unos 3 cm de longitud y se hallaban en las proximidades de una esponja roja (de la que se recogió un fragmento) identificada como *Halicona mediterranea*.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Taormina	6-4-90	2	-12 m	quím+rád
Las Llanas	Dic-89	2	IT	quím+rád
Zumaia	13-4-91	2	IT	exp
St Jean de Luz	14-4-91	1	IT	exp
Blanes	31-7-92	1	-10 m	-
TOTAL		8		
(1)= Número de individuos. (2)= Profundidad. IT= Intermareal rocoso. (3)= Utilización del material (rád= rádula, quím= química).				

Tabla 5.45. Datos de los ejemplares capturados.

5.9.3. Resultados y discusión.

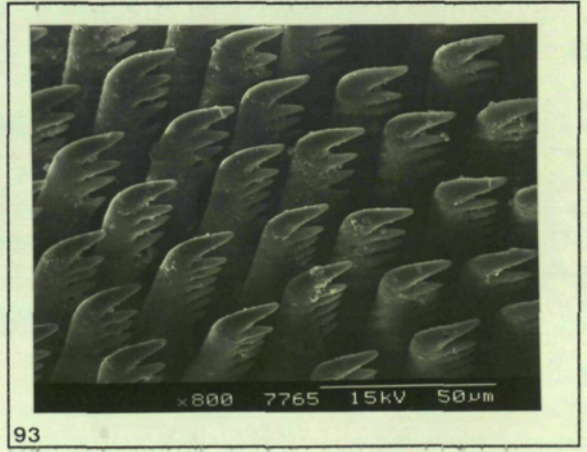
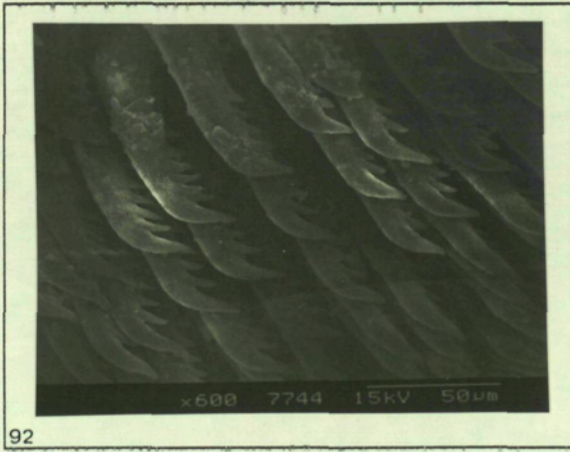
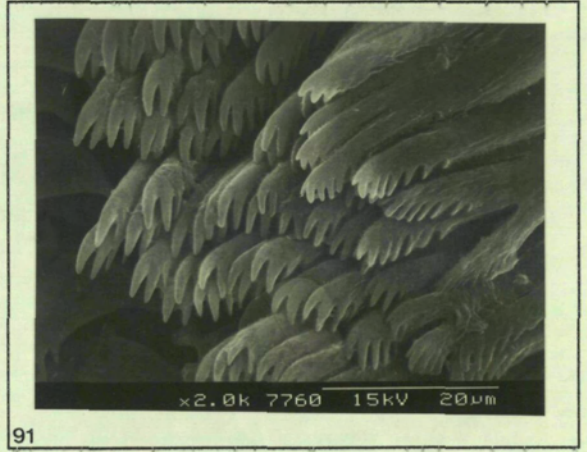
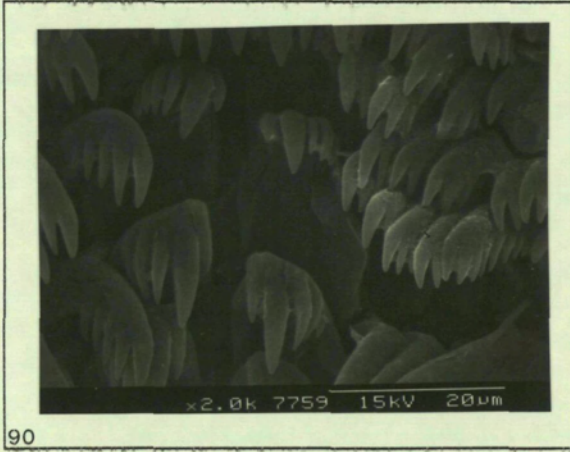
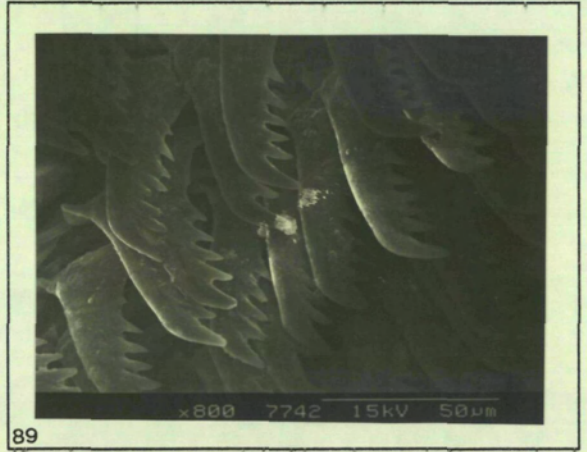
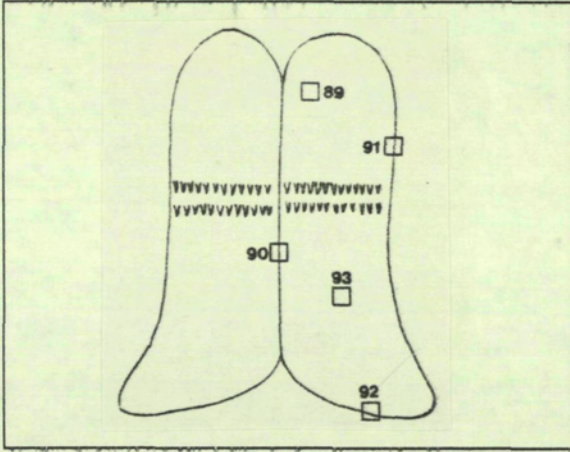
5.9.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

La morfología externa coincide con la descripción general que se ha comentado anteriormente. Las MDFs se localizan en el animal conforme con lo descrito por García *et al.* (1991). No se han efectuado estudios histológicos ni citológicos en esta especie. En cuanto a la morfología de estas MDFs, cabe destacar que son piriformes o lanceoladas, a diferencia de otras especies del género en que son más irregulares.

Rádula y armadura labial.

Las rádulas de los dos animales de Taormina se estudiaron al microscopio electrónico, mostrándose algunas de las fotografías obtenidas en la página siguiente (89-93). Las fórmulas radulares de los dos ejemplares de

Chromodoris purpurea



Sicilia fueron: 33x(38-0-38) y 46x(55-0-55), algo inferiores a los valores dados por Ortea y Pérez (1983) (58x(45-0-45) y 41x(28-0-28)). La armadura labial presenta uncinos bífidos (Ortea y Pérez, 1983).

5.9.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplares de Asturias. Se disecaron 2 animales de unos 7 mm cada uno en las siguientes partes: borde del manto, resto del manto y pie, branquias, glándula digestiva, y resto de glándulas. Se obtuvieron los extractos acetónicos con la ayuda de ultrasonidos, en el modo habitual. En las placas obtenidas se observaba claramente la abundancia y presencia exclusiva de la mezcla fluorescente (UV+) (posibles luteorosina y macfarlandina-A) y de la posible mezcla de norrisolide y polyrhaphina-C en el primer extracto (borde del manto), así como la presencia de una tercera mancha equivalente a la chelonaplysina C. Trazas de la mezcla norrisolide-polyrhaphina C se observaban también en el extracto del resto del manto y en el de la glándula digestiva. Estas placas (en benceno-éter etílico 7-3, y en éter de petróleo-éter etílico 1-1, reveladas con Ehrlich y sulfato de cerio) fueron realizadas con los productos de referencia y calibradas, por lo que si bien no se puede afirmar que los productos sean idénticos a los de *C. luteorosea*, si es bastante probable que sean similares o iguales.

Ejemplares de Taormina. Ambos ejemplares fueron analizados separadamente, y los resultados se exponen en la Tabla 5.46.

El segundo animal se conservó vivo hasta su disección, mientras que el primero fue congelado tras su captura. Tras extracción rutinaria con acetona, las placas en benceno-éter etílico 7-3 mostraron claramente la presencia, en ambos ejemplares, de varios productos preferentemente en el borde amarillo del manto. Sin embargo, parecían distintos de los ejemplares de *C. purpurea* de Las Llanas. Se repitió la placa en mezcla y comparación con los extractos de *C. purpurea* de Asturias y *C. luteorosea* de Asturias. Según esta placa los

productos de *C. purpurea* de Taormina podrían ser diferentes de *C. luteorosea* y de *C. purpurea* de Asturias, que parecen ser similares o iguales. En las secreciones mucosas no se observaron estos productos.

peso seco extracto acetónico		
Primer ejemplar:		
branquias	1.1	<1
borde amarillo del manto (MDFs)	13.4	2.5
resto manto, rinóforos y pie	49.2	14.2
glándulas digestiva y hermafrodita	28.5	1.9
resto de vísceras	10.7	1.9
secreción mucosa	-	-
Segundo ejemplar:		
borde amarillo del manto (MDFs)	16.3	1.5
branquias	2.3	<1
resto manto, rinóforos y pie	36.2	12
glándula digestiva	18.8	0.9
resto de vísceras	11.3	0.4
secreción mucosa	-	48.5 (sales)

Tabla 5.46. Análisis químico de los ejemplares de Taormina (datos en mg).

Todas estas muestras no fueron posteriormente analizadas debido a su escasa cantidad, pero se conservaron en el I.C.M.I.B. para ulteriores estudios comparativos.

En la Tabla 5.47. se resumen los resultados cualitativos para esta especie, teniendo en cuenta que los productos han sido identificados exclusivamente por comparación con los productos de referencia en TLC.

El pH externo de 3 ejemplares procedentes de Zumaia y St. Jean de Luz resultó ser en todos ellos igual a 7.

macfarlandina-A luteorosina	chelonaplysina-C	norrisolide polyrhaphina-C	otros
Oviedo	+	+	-
Taormina	+	-	++
++= Abundante; += presente; -= ausente.			

Tabla 5.47. Comparación entre los ejemplares italianos y asturianos.

Origen de los productos.

El hecho de que los compuestos presentes varíen según la localidad de procedencia corrobora su origen dietético, sobre todo en los compuestos ya mencionados para *C. luteorosea*. Sin embargo, no se ha podido averiguar de qué esponja proceden, además de que los productos de esta especie se han identificado solamente mediante TLC y no poseemos otros datos ni espectros.

De cualquier forma, el tipo de compuestos concuerda con los que podría presentar *Aplysilla sulphurea*, por similitud con los que presentan *A. rosea* (Kazlauskas *et al.*, 1979) y *A. polyrhaphis* (Bobzin y Faulkner, 1989a).

Los experimentos de predación realizados con 3 ejemplares y con las esponjas *Clathrina coriacea*/*Dysidea avara* y *Siphonochalina coriacea*/*Spirastrella cunctatrix* (durante 6 horas el primero y 2 horas 30 min. el segundo), dieron resultados negativos al no detenerse ni morder ninguna de las esponjas (el primer ejemplar se detuvo durante unos minutos sobre *Dysidea avara*).

Función.

Si efectivamente son los mismos productos, es de suponer que deben tener la misma función o similar, que la expuesta en el apartado de *C. luteorosea*.

5.9.3.3. Resumen conclusivo.

C. purpurea presenta compuestos posiblemente similares (o incluso algunos iguales) a los de *C. luteorosea*, localizados preferentemente en el borde del manto (donde se localizan las MDFs), por lo que se presume un origen y una función parecida o igual a lo descrito para *C. luteorosea*.

5.10. *Chromodoris krohni* (Vérany, 1846).

5.10.1. Introducción.

5.10.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Doris krohni.- Vérany (1846).

Glossodoris krohni.- Pruvot-Fol (1954); Wirz-Mangold y Wyss (1958); Haefelfinger (1960); Schmekel (1968b); Ros (1975 y 1978a); Ros y Altimira (1977); Ortea (1977); Fernández-Ovies (1981).

Chromodoris krohni.- Templado (1982); García (1982); Urgorri y Besteiro (1983); Ballesteros (1985); Luque (1986); Cervera y García (1986); Ballesteros *et al.* (1986a y b); Dekker (1986); Marín y Ros (1987).

5.10.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Esta especie se halla descrita con detalle en Schmekel y Portmann (1982). Como resumen podemos decir lo siguiente: cuerpo liso y aplanado. Color general rosa claro, branquias y rinóforos violeta oscuro. Manto con el borde amarillo. Una línea longitudinal amarilla en el centro del manto desde la cabeza hasta la branquia o posterior. Otra línea amarilla, a menudo fragmentada, a cada lado de la anterior, entre rinóforos y branquias. A veces también existe una línea blanca o amarilla en el centro de la cola. Rinóforos con 12 láminas. Tentáculos orales entre digitiformes y triangulares. Branquias con 7 ramas unipinnadas.

5.10.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

García *et al.* (1991), estudiaron 12 ejemplares de esta especie y describieron MDFs en todo el borde del manto, (excepto en los ejemplares de 6-7 mm en que no había frente a los rinóforos). La forma de estas MDFs era redondeada con células vacuolares pequeñas de 10-20 μm y generalmente esféricas. La descripción histológica e histoquímica es la misma que se ha expuesto para *C. luteorosea*, según los mismos autores.

Ecológicas.

Según Ros (1978a) esta especie se alimenta de la esponja *Hymeniacidon sanguinea* (?), siendo de régimen zoófago: micrófago (ramoneador, suctor): de esponjas. El mismo autor lo sitúa en biocenosis de sustratos duros y también en rizomas y hojas de *Posidonia* con epibiontes.

5.10.2. **Material estudiado.**

Se resumen los datos en la Tabla 5.48. Los ejemplares asturianos fueron recolectados en intermareales rocosos, mientras que el resto fueron recogidos a unos 10-15 m de profundidad en sustratos rocosos con biocenosis típicas esciáfilas.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Miseno	6-7-89	1	-15 m	quím
Ischia	1-7-89	2	-10 m	quím
Las Llanas	Dic-89	2	IT	quím+rád
Blanes	23-7-91	4	-12 m	rád+exp
TOTAL		9		
(1)= Número de individuos. (2)= Profundidad. IT= Intermareal rocoso. (3)= Utilización del material. (rád= rádula, quím= química, exp= experimentos).				

Tabla 5.48. Datos de los ejemplares capturados.

5.10.3. Resultados y discusión.

5.10.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

En la Figura 5.18. se pueden observar los esquemas de un ejemplar juvenil y un adulto de *C. krohni*. En el ejemplar juvenil el borde del manto era amarillo, pero el resto de líneas dorsales y la línea caudal eran blancas. Este ejemplar medía 8 mm, y la coloración general del cuerpo era rosa-blanquecino.

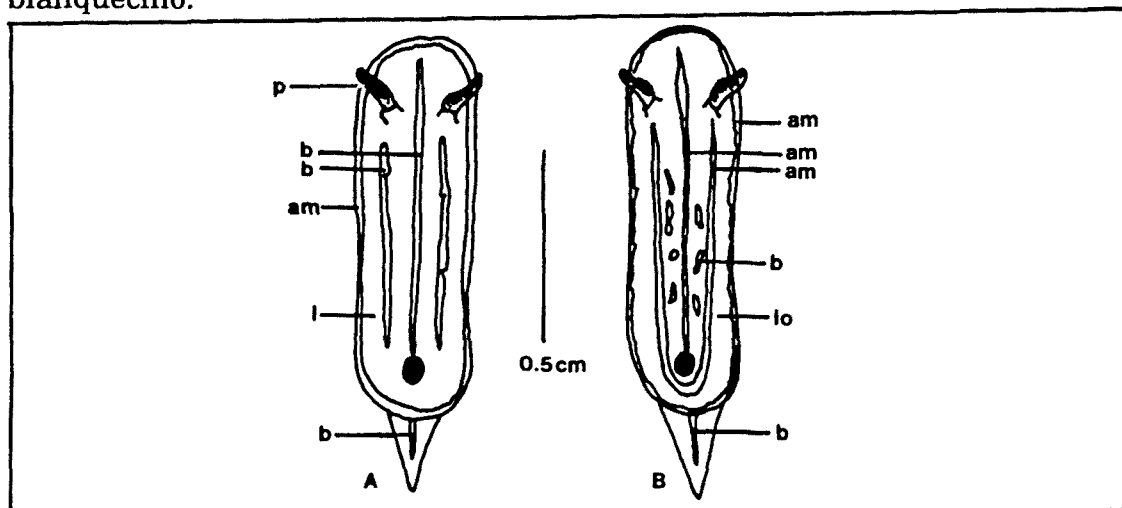


Figura 5.18. Esquemas anatómicos de un ejemplar juvenil (A) y un adulto (B) de *C. krohni* (p= púrpura; b= blanco; am= amarillo; l= lila claro; lo= lila oscuro).

En el ejemplar adulto se observaban además de las tres líneas amarillas dorsales y el borde del manto amarillo, manchas blancas de pequeño tamaño entre la línea central y las laterales. Estas manchas eran redondas o alargadas. Este tipo de diseño externo podría confundirse con los juveniles de *Chromodoris britoi*.

Formaciones dérmicas del manto.

En uno de nuestros ejemplares procedente de Blanes se pudieron contar hasta 7 MDFs en la zona caudal del borde del manto. No fue posible realizar el estudio histológico de esta especie, que según García *et al.* (1991), presenta las MDFs a lo largo de todo el borde del manto.

Rádula y armadura labial.

Se estudiaron las rádulas de un ejemplar de Blanes y uno de Las Llanas al microscopio electrónico. Se incluyen dos fotografías (94-95) que muestran los detalles de los dientes. En la fotografía 94 se muestran los dientes de la zona medio lateral, que son pectinados con numerosos dientes, mientras que en la número 95 se ven con mayor detalle los dientes de la zona central anterior, sin diente central. La fórmula radular del ejemplar de Blanes, de unos 7 mm de longitud, era 27x(12-0-12). Schmekel y Portmann (1982) daban una fórmula de 44x(23-0-23) para un ejemplar de 1 cm.

Puesta.

Los ejemplares de Blanes realizaron en acuario una puesta en forma de cinta aplanada de color blanco. El diámetro de la puesta era algo superior a los 5 mm. Se cultivó en acuario durante varias semanas sin éxito, ya que no fueron liberadas larvas ni juveniles.

Chromodoris krohni

