

INVESTIGACIONES BIOTECNOLOGICAS EN LARVAS DE "LOCO", *CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS* (BRUGUIERE, 1789) (GASTROPODA, MURICIDAE)

BIOTECHNOLOGICAL RESEARCH ON *CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS* (BRUGUIERE, 1789) (GASTROPODA, MURICIDAE) LARVAE

Nibaldo C. Inestrosa, Roberto González, Mauricio A. González, Alejandra Perelman, Juan P. Sánchez, Cecilia Koenig & Enrique Brandan

RESUMEN

El aporte de la investigación básica ha sido decisivo en el desarrollo de cultivos de organismos marinos. Esta contribución tiene facetas relacionadas, por una parte, con el nuevo conocimiento adquirido al estudiar las especies de interés y, por otra, con la creación de tecnologías que permitan manejar cultivares de especies, en este caso, propias del litoral chileno. Un ejemplo interesante es la pesquería del "loco" (*Concholepas concholepas*), cuya explotación está en crisis por la sobreexplotación del recurso. Es necesario buscar alternativas para obtener semillas y reclutas con el objeto de recuperar las poblaciones naturales y su potencial económico. Por estas razones, hemos iniciado un programa destinado al cultivo controlado de la especie. Los objetivos de este trabajo consisten en buscar marcadores del desarrollo larval, identificar moléculas relevantes en el asentamiento y metamorfosis y evaluar la existencia de factores de crecimiento en esta especie.

Tres proteínas larvales de 180, 119 y 111 kDa, respectivamente, no sintetizadas *de novo*, prácticamente desaparecen a las tres semanas post-eclosión, lo que indicaría una transición importante en la larva planctónica. La actividad específica de la acetilcolinesterasa (AChE; EC. 3.1.1.7) aumenta 1,200 veces desde huevo a juvenil, mientras que la actividad de la butirilChE (EC. 3.1.1.8) disminuye concomitantemente. Esta evolución inversa define un "Índice Colinérgico de Desarrollo Larval", cuyo valor estaría relacionado con estados precisos del desarrollo. Las larvas velíferas poseen un activo metabolismo de macromoléculas sulfatadas, evidenciado por la incorporación de sulfato radiactivo, estas macromoléculas sulfatadas tipo proteoglicanos podrían participar en procesos de biomineralización, como por ejemplo, la formación de la protoconcha y más importante en procesos relacionados con el asentamiento. Esto último surge del hecho que la disminución de la concentración del sulfato en el agua de mar determina una menor movilidad en larvas velíferas precompetentes.

Finalmente, nuestros estudios de ingeniería genética muestran que bacterias transformadas con ADN de "loco" poseen secuencias homólogas a las de una sonda para hormona de crecimiento humana, indicando la presencia de factores de crecimiento en el genoma del "loco".

En conclusión, nuestras observaciones indican que el conocimiento de ciertas características moleculares del "loco" podrían ser consideradas como información adecuada para la implementación de tecnologías de manejo larval eficientes, viables y compatibles con la protección de la especie y sus niveles tróficos asociados.

Palabras claves: Loco, desarrollo, asentamiento, inductores, hormonas.

ABSTRACT

Basic research in marine organisms has been an important contribution to the development of aquaculture technologies. On one hand, there is the generation of new knowledge concerning the species of interest and on the other, the creation of technologies that would allow the management of different cultivars, in this case of species that are native to the Chilean coast line. This has been largely ignored in our country in the exploitation of valuable marine resources. The "loco" (*Concholepas concholepas*) fishery is a dramatic example of this situation because it has become an overexploited species. It is urgent to search and develop adequate alternatives to obtain seed and recruits for the repopulation of natural stocks in order to recuperate their economic potential. Considering the above reasons we have begun a program to grow under controlled conditions this organism. The objectives of our work are: search for larval developmental

markers, identify molecules which are relevant in settlement and metamorphosis and to evaluate the presence of growth factors in this species.

Three larval proteins of molecular weights of 180, 119 and 111 kDa respectively which are not synthesized *de novo* almost disappear after three weeks of planktotrophic life indicating a significant transition in the planktonic larvae. The specific activity of acetylcholinesterase (AChE; EC. 3.1.1.7.) increases 1,200 times from egg to juvenile while butyrylChE (EC. 3.1.1.8) diminishes accordingly. This inverse evolution would allow us to define a "Larval Cholinergic Developmental Index", a value related to specific developmental stages. Veliger larvae have an active metabolism of sulfated macromolecules as indicated by radioactive sulfate incorporation; these molecules which probably correspond to proteoglycans may participate in biomineralization process as for example protoconch formation and more importantly in settlement related events. This latter idea was suggested by the fact that decreasing sulfate concentration in the sea water determines a behavioral response characterized by a slow down of swimming in pre-competent veliger larvae.

Finally, our genetic engineering studies demonstrated that recombinant bacteria, transformed with "loco" DNA have sequences that are homologous to that of a human growth hormone probe indicating the presence of such sequence in "loco" genome. Taken together our studies indicate that some "loco" characteristics could be used for the development of efficient and viable technologies of larval management which are compatible with the protection of the species and their associated trophic levels.

Key words: Loco, development, settlement, inducer, hormone.

INTRODUCCION

La investigación básica ha contribuido en forma decisiva a mejorar la producción de cultivos de ostras, abalones, ostiones, mitilidos, erizos y otros invertebrados marinos comercialmente valiosos (Colwell, 1983; Morse, 1984a). El uso de moléculas conocidas como inductores, que en forma específica provocan asentamiento y metamorfosis de larvas competentes, refleja en forma elocuente este aporte (Burke, 1983; Crisp, 1984; Hadfield, 1984). Estos inductores, asociados a sustratos donde se produce la metamorfosis y el reclutamiento definitivo de la larva en el bentos, son reconocidos por receptores quimiosensoriales de la larva (Morse, 1989). El reconocimiento del inductor por los receptores desencadena una respuesta global en la larva, cuya expresión final la constituyen los sorprendentes cambios morfogenéticos que acompañan la metamorfosis. Entre los inductores se encuentran moléculas tan diversas como neurotransmisores: ácido gamma-aminobutírico (GABA) para el abalone *Haliotis rufescens* y otras especies (Morse et al., 1979); L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y noradrenalina en la ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg) (Coon et al., 1985); ácidos grasos libres en el poliqueto *Phragmatopoma californica* (Fewkes) (Pawlik & Faulkner, 1986) y el epóxido del delta-tocotrienol en el hidroide *Coryne uchidai* (Kato et al., 1975). En el caso de *Haliotis*, utilizando GABA se ha conseguido un manejo extraordinariamente eficiente del asentamiento y metamorfosis, obteniéndose millones de reclutas que pueden eventualmente trans-

formarse en adultos (Morse, 1984a). Por otro lado, se ha conseguido sustituir el uso de GABA, L-DOPA y otros inductores mediante la utilización del ion K^+ , el cual, a concentraciones de hasta 20 mM, depolariza la membrana epitelial y desencadena la metamorfosis y reclutamiento (Yool et al., 1986; Pechenik & Heyman, 1987).

La aplicación del conocimiento básico en el manejo de invertebrados bentónicos no se reduce solamente al empleo de inductores del asentamiento y metamorfosis. En efecto, se están utilizando también técnicas de manipulación genética para obtener poblaciones homogéneas de individuos de buena calidad, aumentar la tasa de crecimiento e incluso extender los períodos de explotación, como en el caso de la ostra americana (Morse, 1986; Allen et al., 1986).

Esta situación contrasta claramente con la de *Concholepas concholepas* (Bruguère, 1789), "loco", un murícido que vive exclusivamente en las costas de Perú y Chile (Stuardo, 1979). Este gastrópodo está en peligro de extinción por la sobreexplotación de las poblaciones naturales, debido a su gran valor comercial (Castilla, 1983). Siendo el "loco" una especie única en el mundo (Castilla, 1976), la tecnología para su cultivo no puede ser importada como ha sido el caso de la mayoría de los cultivos marinos que se explotan en la actualidad en nuestro país. Desde esta perspectiva, hemos identificado tres problemas que deben ser solucionados para emprender el cultivo masivo de esta especie: 1) *larga vida pelágica*: la larva velígera tiene un largo período de residencia en el plancton, el cual puede

durar hasta 4 meses (DiSalvo, 1988). Esto se ha considerado como una limitante potencial en el cultivo controlado del "loco" por lo prolongado de esta etapa, lo cual ocasiona problemas técnicos en la mantención de ellos. 2) *asentamiento y metamorfosis larval*: no se conocen los factores inductores del asentamiento y metamorfosis en este organismo. La transición plancton-bentos sería una de las etapas más críticas en todo el proceso de crecimiento del "loco", a lo cual se debe agregar el desconocimiento absoluto sobre el proceso de reclutamiento en el bentos, y 3) *alimentación*: es necesario definir un régimen alimenticio de las larvas y encontrar condiciones para acelerar el crecimiento de los juveniles y adultos. Con el propósito de conseguir una tecnología adecuada para cultivar "locos" en condiciones controladas, hemos iniciado un programa con especial énfasis en aspectos de biología celular y molecular de este gastrópodo.

Los objetivos del presente trabajo son: 1) encontrar marcadores moleculares del desarrollo. Para obtenerlos hemos analizado las características de la síntesis y modificación post-traducciona de polipéptidos de diferentes estados larvales, así como también, hemos estudiado el comportamiento ontogénico de la acetilcolinesterasa (AChE: E.C. 3.1.1.7), una enzima del sistema nervioso que puede servir como un marcador específico de ciertas etapas del desarrollo; 2) estudiar el metabolismo de macromoléculas sulfatadas, por la importancia que podrían tener en el asentamiento (Morse *et al.*, 1988) y en los procesos de biomineralización de la concha (Mann, 1988; Krampitz & Grazer, 1988), y 3) evaluar la presencia de genes de hormonas de crecimiento en este organismo, con la idea de producir las hormonas respectivas y poder usarlas para acelerar la tasa de crecimiento de juveniles y adultos de *Concholepas concholepas*.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

$\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ (carrier free) y S^{35} -metionina (688,8 Ci/mmol) fueron adquiridos a Dupont, New England Nuclear, USA. Selenato de sodio, DEAE-Sephacel y Sepharose CL-4B fueron comprados a Sigma Chem. Co., USA. El agua de mar utilizada en este trabajo fue obtenida en la costa del Pacífico, frente a la Estación Costera de Investigaciones Mari-

nas (ECIM), Las Cruces, y fue filtrada por filtros Millipore de 0,45 μm . El agua de mar artificial se preparó de acuerdo a la fórmula IV, Woods Hole Marine Biology Labs., USA (Cavanaugh, 1956). Las enzimas de restricción y el vector KS BlueScript usados en estos experimentos fueron comprados en Pharmacia, USA.

Cápsulas: obtención y mantenimiento de embriones

Cápsulas, reclutas y juveniles de "loco" fueron recolectados por buceo autónomo en Quintay (33°20'S, 71°40'O), Las Cruces (33°15'S, 71°38'O 610) y El Clarón (32°42'S, 71°28'O), V Región. La edad relativa de cada grupo de cápsulas fue estimada por examen microscópico de una muestra de embriones de acuerdo a la descripción de Gallardo (1973). Los juveniles y reclutas fueron mantenidos en acuarios con agua de mar artificial con aireación constante entre 12 y 16°C; las cápsulas se mantuvieron en acuarios con sistema de circulación cerrada de agua de mar, purificada por filtración a través de discos Millipore de 0,45 μm . Los juveniles fueron alimentados con choritos, *Perumytilus purpuratus* (Lamarck), cada 2 días y ayunados 4 días antes de ser disecados y procesados para los experimentos.

Manejo experimental de embriones

Para cada experimento se disecó un número adecuado de cápsulas en condiciones estériles en agua de mar filtrada o artificial, bajo lupa Nikon-TMS. El número de larvas se determinó directamente en la lupa luego de la disección.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y radioautografía

Los polipéptidos de cada estado fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1971), según lo descrito previamente (Inestrosa & Méndez, 1983). De 10 a 100 embriones fueron solubilizados en amortiguador de carga 3x (Tris-HCl 195 mM, ditio-treitol 15 mM y SDS al 6%) a temperatura ambiente y luego hervidos por 5 min antes de ser cargados en el gel. En estas condiciones, es posible analizar los polipéptidos de 1-3 de larva velígera por carril de un gel de 0,8 mm de espesor. Para analizar los polipép-

tidos radiactivos, los geles fueron secados en papel Whatmann 3 MM y expuestos a -70°C con placas Kodax X-OMAT AR5, con o sin placas intensificadoras Dupont Lightning PLUS o Cronex, según las cuentas estimadas por centelleo o Cerenkov. Para S^{35} el tiempo fue de aproximadamente 16 horas, para 800 cpm por banda de 100 ng de proteína teñida con azul de Commassie. Para el fósforo radiactivo, las cpm fueron estimadas directamente en el gel con un detector Geiger y expuestas 12 horas cada 1.000 cpm por banda. Algunos geles fueron fluorografiados (Bonner & Laskey, 1976) con las siguientes modificaciones: una vez desteñido el gel, se lavó 20 min con dimetilsulfoxido (DMSO) a 37°C con agitación leve y a continuación se incubó por 45 min en 80 ml de PPO al 10% en DMSO. El gel fue lavado en 2 recambios de agua desionizada, secado y expuesto.

Incorporación de metionina en polipéptidos de velígeras

La incubación se realizó con 1 larva/ $\mu\text{l}/\mu\text{Ci}$ de S^{35} -metionina por 2 horas a 15°C en agua de mar filtrada por filtros Millipore de 0,45 μm . Al final de este periodo las larvas velígeras se lavaron con agua de mar y fueron homogenizadas en amortiguador de carga 3x a 4°C , luego se diluyeron con amortiguador de corrida y se hirvieron por 3 min antes de cargarlos en un gel de poliacrilamida al 12%. Los geles fueron teñidos, secados y expuestos según se detalló anteriormente.

Incorporación de fósforo radiactivo a larvas velígeras

Treinta larvas velígeras se incubaron en 1 ml de agua de mar artificial con 300 μCi de P^{32}O_4 por 2 horas a 15°C . Las muestras fueron procesadas y analizadas en geles de poliacrilamida, tal como se describió previamente (Ruiz *et al.*, 1987).

Efecto del sulfato en la movilidad larval

Grupos de 25-50 larvas velígeras fueron incubadas en placas de Petri de 14 cm de diámetro en agua de mar artificial con sulfato 125 μM o 25 mM (agua de mar normal). Al cabo de 10 min, se determinó el número de larvas presentes entre los 0,5 y 3,0 cm de diámetro y las que se encontraban entre los 3 cm y el borde de la placa; estos parámetros fueron elegidos entre diferentes tiempos y

distancias analizadas. Las larvas fueron obtenidas de cápsulas próximas a la eclosión en agua de mar, con una concentración de sulfato similar a la ensayada y, adicionalmente, se evaluó el efecto de la baja concentración de sulfato en larvas obtenidas en agua de mar normal.

Incorporación de sulfato en larvas velígeras

Entre 500 a 1.500 larvas velígeras fueron incubadas en agua de mar artificial sin SO_4 y con 10 μCi de $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ o con 10 μCi de S^{35} -metionina en las concentraciones de sulfato indicadas. A diferentes tiempos de postincubación, las larvas se lavaron y precipitaron con 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 12%, a 4°C . Luego de 6 horas se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 min. El sobrenadante se descartó y los precipitados se resuspendieron en 1,0 ml de TCA y se centrifugaron nuevamente; esto se repitió tres veces. Finalmente, los precipitados fueron disueltos en 1,0 ml de NaOH 1 N por 3 horas a 37°C . Se agregaron 0,25 ml de HCl 4 N y 0,5 ml de H_2O y las muestras se traspasaron a un frasco de contador de centelleo, a las cuales se les agregaron 20 ml de mezcla para contar y la radiactividad se determinó en un contador de centelleo Beckmann LC 100 (Brandan *et al.*, 1989).

Marcación y caracterización de proteoglicanos insolubles provenientes de larvas velígeras

Entre 5.000 y 10.000 larvas velígeras fueron incubadas con 100 μCi de $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$, sulfato de sodio 1 mM por 18 horas a 18°C en agua de mar artificial. Luego las larvas se lavaron con agua de mar y se homogenizaron en amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Triton X-100 al 0,1% y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM. El homogenizado se centrifugó a 14.000 rpm, por 15 min, a 4°C y el precipitado se rehomogenizó y centrifugó. El precipitado insoluble que contenía proteoglicanos fue disuelto en guanidina-HCl 4 M, acetato de sodio 50 mM (pH 6,0) y PMSF 1 mM durante 8 horas con agitación a 4°C . La fracción soluble fue separada en una columna de filtración Sephadex G-50 \times 18 cm, equilibrada en acetato de sodio 50 mM (pH 6,0), urea 8 M y Triton X-100 al 0,1%. La radiactividad eluida en el volumen de exclusión fue analizada en una columna de inter-

cambio iónico DEAE-Sephacel de 5,0 ml, equilibrada en acetato de sodio 50 mM, NaCl 0,2 M, urea 8 M y Triton X-100 al 0,1%. La columna se lavó con 25 ml del mismo amortiguador y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,2 a 1,5 M disuelto en el mismo amortiguador con un flujo de 8,0 ml/hr, recolectándose fracciones de 1,0 ml. Finalmente, la columna se lavó con 15 ml del mismo amortiguador y NaCl 3 M. Las fracciones radiactivas se concentraron (Brandan & Inestrosa, 1987a) y se fraccionaron en columnas de Sepharose CL-4B de 0,7×100 cm, equilibradas en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 0,35 M y SDS al 1%, con un flujo de 6,0 ml/hr.

La reacción de betaeliminación de las cadenas sulfatadas se realizó de acuerdo a Brandan & Inestrosa (1987b). Los productos de la reacción se fraccionaron en columnas de Sepharose CL-4B.

Estructura del epitelio del pie de juveniles de *C. concholepas*

Para analizar la estructura del pie, se utilizaron ejemplares juveniles de "loco" de 1,3 a 1,7 cm de diámetro anteroposterior de la concha.

Para el estudio de microscopia de luz, se obtuvieron cortes longitudinales y transversales del pie, los que se fijaron en solución de Bouin con NaCl 3% (Huaquín L., comunicación personal). Luego, las muestras fueron deshidratadas en etanol y se incluyeron en Paraplast. Cortes de 6 µm se tiñeron con hematoxilina-floxina pH 7,0; ácido periódico-Schiff's (P.A.S.), pH 4,5, y con azul de Toluidina, pH 1,5.

Para analizar la ultraestructura de la epidermis ventral y lateral del pie, se cortaron trozos de tejido de aproximadamente 1 mm³ y se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3% y sacarosa 0,8 M, en amortiguador cacodilato 0,05 M (pH 7,8). Luego se fijaron en OsO₄ al 1% con sacarosa 0,8 M (Lawson-Kerr & Anderson, 1978), para finalmente ser deshidratados con acetona e incluidos en Epon. Los cortes ultrafinos obtenidos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, siendo luego observados y fotografiados en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I A (Koenig *et al.*, 1987).

Determinación de AChE

Los embriones, reclutas y juveniles, fueron homogenizados (1:5 p/v) en amortigua-

dor Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Triton X-100 0,5% y NaCl 1 M, en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: EDTA y EGTA 2 mM; benzamidina 20 µg/ml; bacitracina 1 mg/ml; N-etilmaleimida 0,1 mM e inhibidor de tripsina de poroto soya 0,25 µg/ml, en un homogenizador vidrio-vidrio (Inestrosa *et al.*, 1988).

El ensayo enzimático se realizó mediante el método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961), usándose como sustrato yoduro de acetiltiocolina 0,75 mM y como revelador de la reacción el ácido ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB), midiéndose la absorbancia a 412 nm. Como inhibidor específico de la AChE (EC. 3.1.1.7) se usó el dibromuro BW284c51 10 µM y para la butirilcolinesterasa (EC. 3.1.1.8) iso-OMPA a una concentración de 0,1 mM.

Construcción de una genoteca de *C. concholepas*

a) Aislamiento de ADN genómico de *C. concholepas*

Se utilizaron 2 gr de tejido muscular de ejemplares juveniles, los que se pulverizaron luego de ser congelados en nitrógeno líquido y se homogenizaron con 10 ml de acetato de amonio 0,25 M (pH 5,0) durante 5 min. Se centrifugó a 1.000 rpm por 10 min y el precipitado se lavó dos veces con el mismo amortiguador, luego de lo cual se resuspendió en 2 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM) con 100 µg/ml de proteinasa K, agregándose 5 ml de amortiguador de lisis (Tris-borato 250 mM (pH 8,2); EDTA 50 mM; SDS 2% y NaCl 100 mM). Esta mezcla se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y se extrajo, secuencialmente, con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Luego se precipitó con tres volúmenes de etanol por 16 horas a -20°C. Se centrifugó a 12.000 rpm por 15 min y se secó el precipitado, el cual fue resuspendido en 2 ml de 100 µg/ml de ARNasa, en amortiguador TE por 30 min a 37°C, después de lo cual nuevamente se extrajo con las mezclas de los solventes fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y cloroformo/alcohol isoamílico, para precipitar finalmente el ADN con tres volúmenes de etanol. Este precipitado final se resuspendió en TE, recuperándose 0,5 mg de ADN por gramo de tejido (Inestrosa *et al.*, 1989).

b) *Aislamiento del plasmidio usado como vector (KS-BlueScript)*

El ADN del plasmidio se aisló según la técnica descrita por Valenzuela & Méndez (1982).

c) *Ligación de los fragmentos de ADN cromosomal de C. concholepas al vector KS BlueScript*

El ADN cromosomal fue digerido hasta un promedio de 1.000 a 2.000 pares de bases (pb) con la enzima MboI, tal como se describe en Maniatis *et al.* (1982). El vector fue linearizado con la enzima BamHI. Todas las digestiones con endonucleasas fueron realizadas en los amortiguadores recomendados por el proveedor. Con el fin de evitar la autoligación del vector, se removieron los grupos fosfatos del extremo 5' con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), según el método descrito por Maniatis *et al.* (1982). En el ensayo de ligación se utilizó una proporción de ADN cromosomal, respecto del vector de 3:1 en amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 20 mM, adenosintrifosfato 10 mM y ADN ligasa del fago T₄ 100 U. La reacción se efectuó en un volumen final de 50 µl, incubando durante 16 horas a 16°C. La mezcla de ligación se utilizó directamente para transformar células bacterianas competentes. La ligación fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TEA (Tris-HCl 40 mM (pH 8,0); EDTA 2 mM y acetato de sodio 20 mM). La electroforesis se realizó en el mismo amortiguador a 75 mA; las muestras fueron previamente desnaturalizadas con una solución que contenía glicerol 25%; SDS 0,5%; azul de bromofenol 0,025% y EDTA 12 mM. Para la visualización de las bandas, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml durante 15 min y se iluminó el gel con luz UV de una longitud de onda mayor que 300 nm.

d) *Transformación de bacterias*

Se prepararon células competentes XLI Blue y se transformaron con 1 µg/µl de ADN ligado (Hanahan, 1985). El crecimiento de las células transformadas se realizó en un medio que contenía X-GAL-IPTG. El IPTG es un inductor de la enzima beta-galactosidasa (un gen incorporado en la secuencia de ADN por delante del sitio de clonamiento de pKS) y X-GAL es un sustrato de la enzima,

que en reacción positiva da coloración azul y en reacción negativa permanece blanca. Si un fragmento es clonado en pKS no se produce la beta-galactosidasa, y la colonia en un medio con X-GAL-IPTG dará un color blanco. Las colonias transformadas (blancas) fueron analizadas mediante hidrólisis alcalina, para comprobar si poseían los insertos. La genoteca fue guardada en cuatro réplicas en filtros de nitrocelulosa (Grunstein & Hogness, 1975).

e) *Detección de secuencias homólogas a hormona de crecimiento humana en colonias recombinantes*

Se realizó un análisis primario de la genoteca mediante hibridación, con una sonda de la hormona de crecimiento humana (Beltz *et al.*, 1983). La sonda que contenía la totalidad (80%) del ADN complementario de la hormona de crecimiento humana fue obtenida por doble digestión del plasmidio pSP64-GH-HA (Rizzolo *et al.*, 1985) con las enzimas EcoRI y Hind III. El fragmento correspondiente a la hormona del crecimiento fue aislado y marcado con dCTP-P³² (Maniatis *et al.*, 1982).

RESULTADOS

A) Marcadores moleculares del desarrollo de *C. concholepas*

Hemos iniciado este estudio analizando algunas características estructurales de los estadios iniciales del desarrollo del "loco", para distinguir algunos rasgos esenciales de estas etapas. En la Figura 1 se muestran blástulas obtenidas por disección de las cápsulas mostrando actividad de segregación y división celular en uno de sus polos (Gallardo, 1973). En la Figura 2A y B se observan estados de larvas preveligeras y larvas veligeras ya maduras, y en 2 C se observa un velo bilobulado ciliado, el cual ha sido separado de la protoconcha de una larva por aspiración a través de una pipeta Pasteur de bordes cortantes. Mediante este procedimiento se puede conseguir un número importante de velos funcionalmente activos en un corto tiempo. Con estos embriones se realizaron los estudios que se describen a continuación:

1. Inicialmente decidimos identificar marcadores moleculares del desarrollo analizando el patrón de polipéptidos presente en cada etapa mediante electroforesis-SDS en ge-

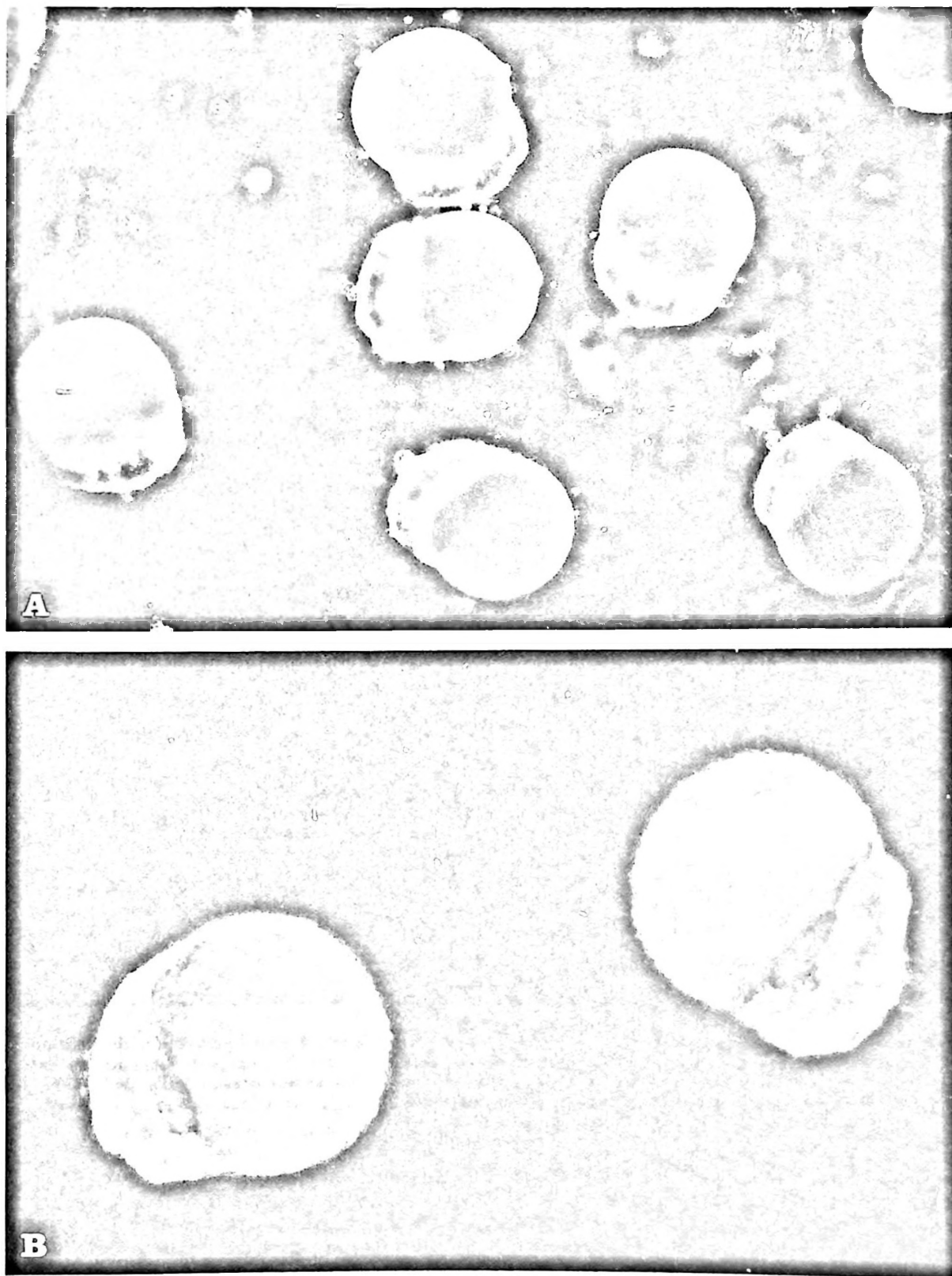


Figura 1. *Microscopia óptica de blástulas de "C. concholepas" obtenidas por disección de cápsulas. A. Blástulas de un diámetro polar aproximado de 170 μm . B. Aumento mayor de la misma preparación; segmentación asimétrica (para una discusión detallada, ver Gallardo, 1973).*

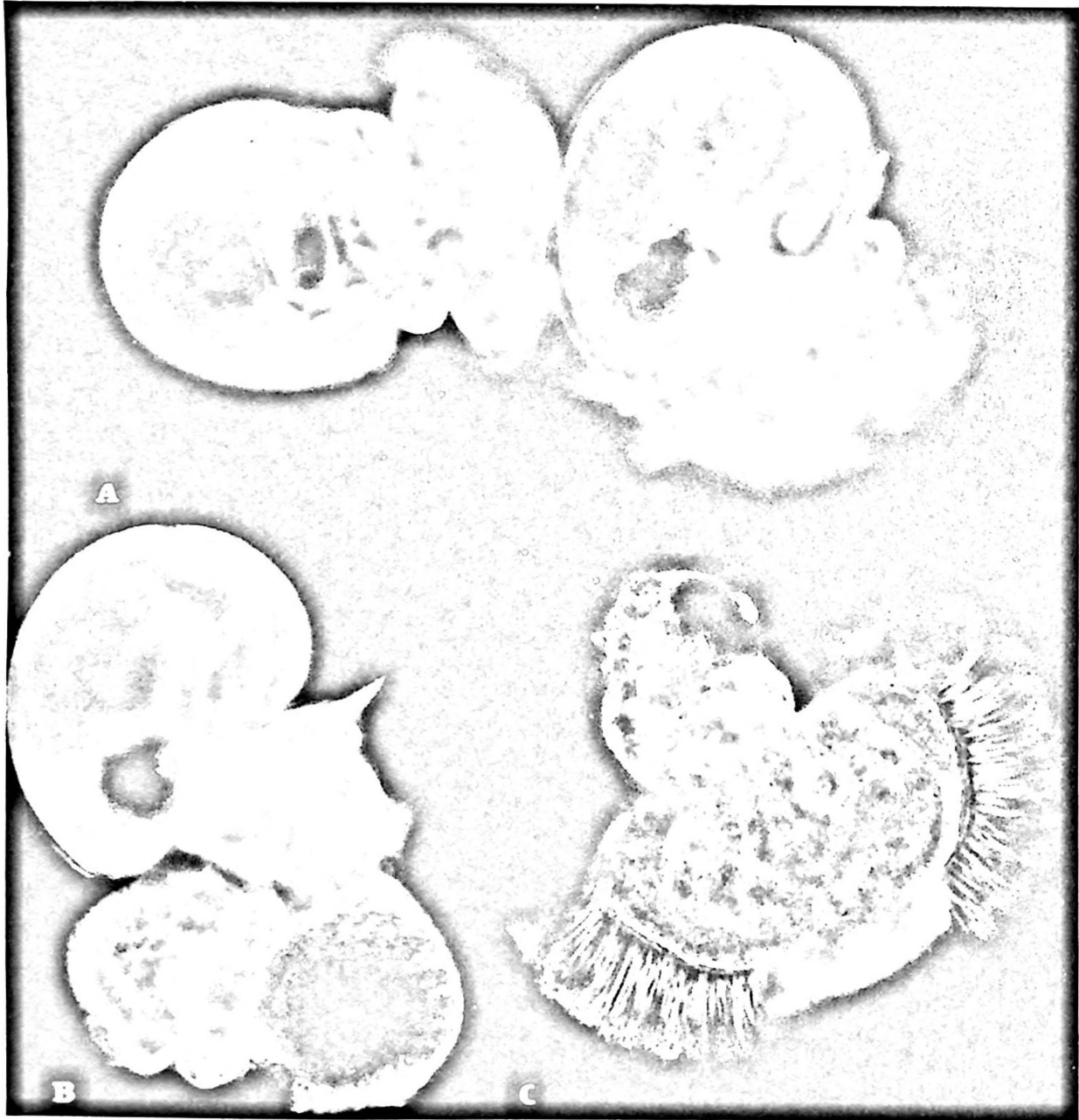


Figura 2. *Microscopía óptica de larvas prevelígeras y velígeras de "loco"*. A. Larva prevelígera insinuando formación de protoconcha y velo con sistema ciliar desarrollado. A la derecha, velígera con protoconcha definida y músculo velar; ver también B. En C, se muestra un velo bilobulado desarrollado que ha sido disecado intacto de la protoconcha, y sistema ciliar muy desarrollado. Los cilios mantienen su actividad.

les de poliacrilamida. La Figura 3 muestra el patrón observado en huevos, trocóforas y velígeras, el cual se caracterizó fundamentalmente por 3 polipéptidos de los siguientes pesos moleculares relativos: 180, 119 y 111 kilodaltons (kDa). Todos ellos tienden a disminuir a medida que avanza el desarrollo. También se muestran los polipéptidos presentes en el mucus de las cápsulas de "loco"

observándose 2 abundantes especies de 39 y 30 kDa, las cuales disminuyen a medida que se acerca el tiempo de eclosión de la cápsula. En un estudio más detallado, en el que se incluyeron distintos estadios de desarrollo, se pudo definitivamente establecer que las tres proteínas de alto peso molecular (180, 119 y 111 kDa) efectivamente disminuían a medida que progresaba el desarrollo em-

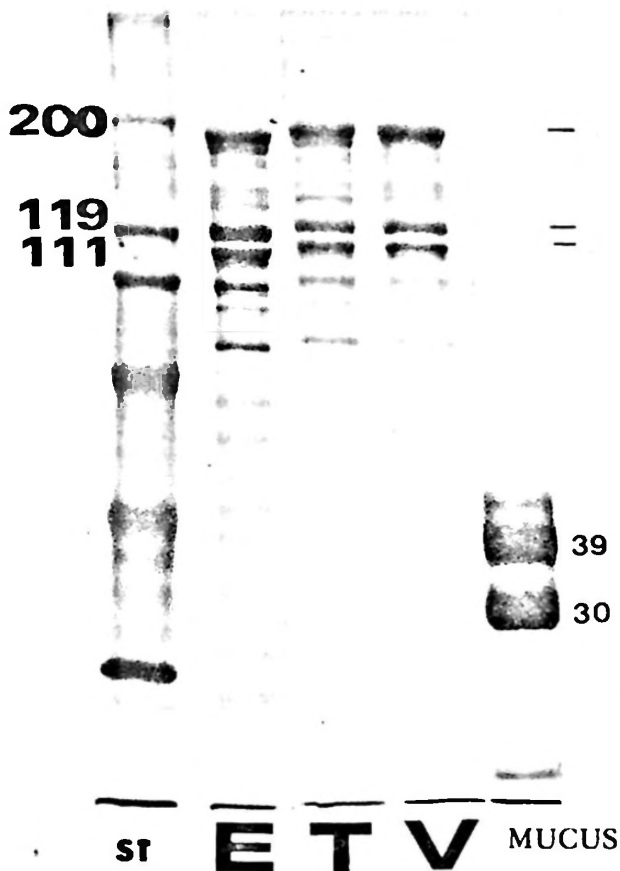


Figura 3. Perfil polipeptídico de distintos estadios del desarrollo de "C. concholepas". Geles de poli-acrilamida-SDS al 10% en presencia de mercaptoetanol, de los siguientes estados: huevos (E), preveligeras (T), veligeras (V) y material contenido en las cápsulas (mucus). el primer carril corresponde al perfil de estándares de peso molecular.

brionario de *C. concholepas*, lo que se muestra claramente en la Figura 4. El patrón de polipéptidos obtenidos no varió en ausencia de un agente reductor como 2-mercaptoetanol o ditiotreitól (datos no presentados), lo que indica que dichos polipéptidos no provienen de una proteína de mayor peso molecular.

2) Para estudiar las proteínas menos abundantes, se incubaron organismos en los distintos estados del desarrollo con dos marcadores radiactivos: S^{35} -metionina para polipéptidos y $P^{32} O_4$ para fosfoproteínas. Como se muestra en la Figura 5, es claro que la larva del "loco" sintetiza polipéptidos en su mayoría menores de 100 kDa y también es aparente que las tres proteínas de alto peso molecular (180, 119 y 111 kDa) no incorporan S^{35} -metionina durante el mismo período

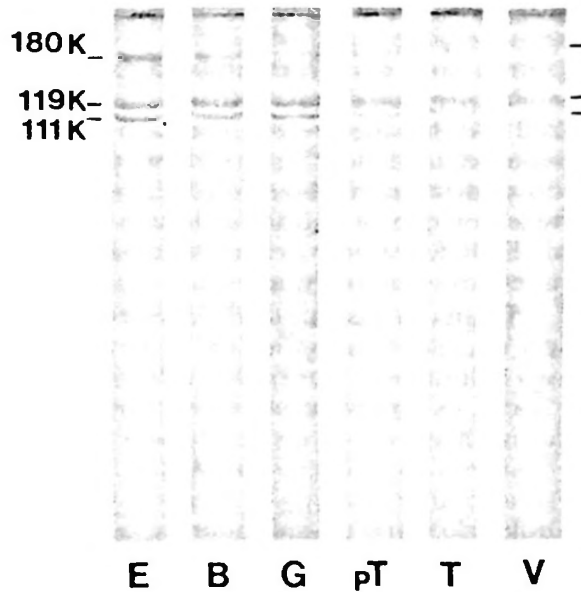


Figura 4. Análisis de la desaparición de tres polipéptidos de alto peso molecular durante la embriogénesis de "C. concholepas" en geles de poli-acrilamida-SDS al 10% reducidos. Para realizar este experimento se procesó el mismo número de individuos en cada carril. Huevos (E), blástulas (B), gástrulas (G), pretócóforas (pT), trocóforas transientes (T) y veligeras (V).

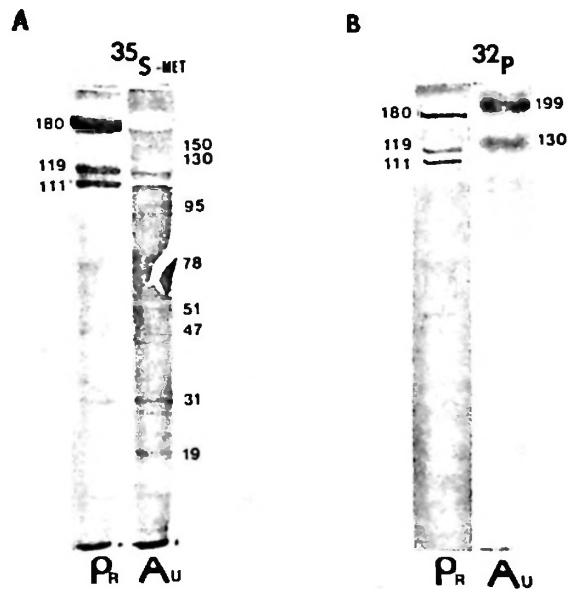


Figura 5. Incorporación de precursores marcados, metionina- S^{35} y $P^{32} O_4$ en polipéptidos de preveligeras de "loco". A. Análisis por autorradiografía (Au) de polipéptidos que incorporaron S^{35} -metionina muestra el perfil polipeptídico evidenciado por tinción con azul de Coomassie (Pr). B. Análisis de los polipéptidos que incorporaron P^{32} por autorradiografía (Au). El control se evidencia como en A.

do. Por otra parte, cuando se estudia el patrón de proteínas fosforiladas, éste corresponde sólo a polipéptidos de alto peso molecular, uno de 130 y otro de alrededor de 200 kDa, los que presentan un alto grado de incorporación de P^{32} ; este último polipéptido podría ser un buen candidato para un receptor que se autofosforile tipo receptor de EGF. Este punto debería ser aclarado por nuestros estudios en marcha.

3) Una de las características deseadas en un marcador específico del desarrollo que sea relevante a la tecnología de cultivo del "loco", es aquel que aumente o varíe significativamente en sus niveles durante la transición de larvas veligeras o reclutas. Esta es una condición necesaria, con el objeto de poder utilizarlo como un indicador de la maduración de larvas precompetentes a larvas competentes en asentamiento. En relación a esto, hemos estudiado el comportamiento de un enzima del sistema nervioso: la AChE, que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas (Inestrosa, 1986). En la Figura 6 se muestran las variaciones que presentan los niveles de la enzima en función de los diferentes estados de desarrollo, siendo de particular interés el cambio de actividad enzimática desde la larva veligera (15 U/g proteína) a juveniles recién asentados (120 U/g proteína). Otro parámetro potencialmente más útil que el anterior es el estudio de la razón AChE/colinesterasas inespecíficas (González *et al.*, 1989). La butirilcolinesterasa (BuChE; EC 3.1.1.8) es un tipo de

colinesterasa inespecífica que, en general, se encuentra en grandes cantidades en etapas tempranas del desarrollo, mientras que la AChE aumenta a medida que progresa el desarrollo (Inestrosa & Ruiz, 1985). La Tabla I muestra la variación en la razón AChE/BuChE, siendo este cociente bajo en los estados iniciales de huevo y blástula, para aumentar ostensiblemente en juveniles. Podríamos, por lo tanto, tener que cada valor del cociente AChE/BuChE correspondería a un estado definido de larva, sea ésta precompetente o competente. Esto podría entregarnos, por tanto, un índice del grado de desarrollo en base a un valor objetivo de fácil estimación y certeza.

Tabla I
Aumento de la razón AChE/BuChE durante el desarrollo de *Concholepas concholepas*

Estados de desarrollo	AChE/BuChE
Huevo	0,3
Trocófora	0,4
Veliger	0,6
Recluta	2,5

La actividad AChE se midió en presencia de 10^{-4} M iso-OMPA con acetiltiocolina como sustrato. La actividad de BuChE se midió en presencia de 10^{-4} M BW284c51 con butiriltiocolina como sustrato.

B) Consideraciones acerca del asentamiento y metamorfosis de *C. concholepas*

A continuación se discutirán los elementos que creemos de interés considerar para enfrentar la identificación de los inductores que definen el asentamiento de larvas de "loco".

En primer lugar, independientemente de cuál sea el inductor, éste debe producir un impacto en la conducta de la larva planctónica, en su expresión génica, en la diferenciación y en el crecimiento del recluta asentado. La señal inductora externa al organismo debería interactuar con *receptores quimiosensoriales* en el epitelio de los velos larvales. Quedan así definidas una *respuesta conductual* macroscópica y una *respuesta morfogenética*, las que pueden o no ser gatilladas por el mismo inductor. La primera de ellas puede requerir más de un componente, ya que la larva estando en el plancton debe "bajar" al bentos y

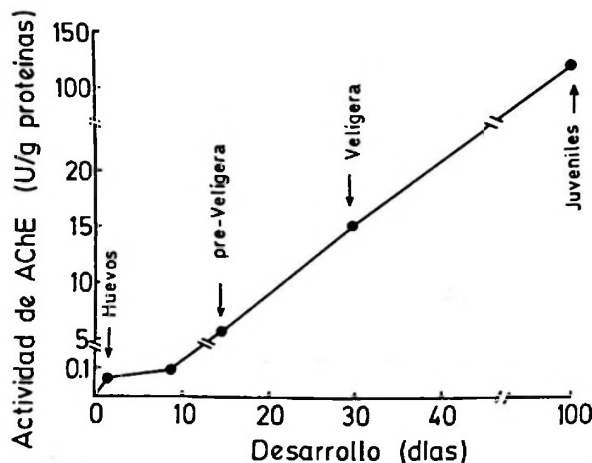


Figura 6. Ontogenia de la AChE en el desarrollo de "*C. concholepas*". La actividad de AChE fue determinada mediante el método de Ellman y cols. (1961), en distintas etapas del desarrollo (ver texto).

esto podría estar mediado por fototropismo negativo, por geotropismo positivo o por densidades de flotación fluctuantes. Para facilitar la discusión usaremos el ejemplo del abalone rojo (*Haliotis*), en el cual, aparentemente, un solo elemento desencadena ambas respuestas. En el caso del "loco", pensamos que las posibles señales externas deben incluir una o una combinación de los siguientes elementos:

1) *Sustancias tipo neurotransmisores*: Como por ejemplo GABA en *Haliotis* (Morse *et al.*, 1979) o noradrenalina o L-DOPA en *Crassostrea* (Coon *et al.*, 1985) o sustancias involucradas en la biosíntesis de neurotransmisores, como por ejemplo el caso de la colina, precursor de la acetilcolina, que en *Phestilla sibogal*, un gastrópodo nudibranquio, induce metamorfosis (Hirata & Hadfield, 1986). En este espectro de elementos que inciden sobre el estado de despolarización de la membrana del epitelio larval, es indudable que un cambio en la composición iónica del medio ambiente podría producir el efecto sin tener que mediar la interacción "agentes externo-receptor sensorial". Al respecto, la despolarización por K^+ (Baloun & Morse, 1984) ha probado ser efectiva en diversos gastrópodos como *Haliotis*, *Phestilla* y *Crepidula* (Yool *et al.*, 1986; Pechenik & Heyman, 1987).

2) *Sustancias asociadas a los sitios de reclutamiento*: En este grupo de posibles inductores se pueden diferenciar tres tipos:

a) Aquéllas relacionadas con "feromonas" liberadas por organismos juveniles o adultos de *C. concholepas*, las cuales servirían para definir un tipo de asentamiento gregario. Evidencia de que esto podría ocurrir en el caso del "loco", se puede encontrar en las observaciones de Moreno *et al.*, (1986) en el Sur de Chile; por otra parte, en otros gastrópodos como *Haliotis discus hannai*, está bien demostrada la existencia de un asentamiento gregario inducido por sustancias químicas (Seki & Kan-no, 1981).

b) Inductores producidos por organismos vecinos a los sitios de asentamiento del "loco", entre ellos algas pardas como *Lessonia nigrescens* (Bory), algas azules filamentosas, cirripedios como *Balanus laevis* (Bruguère), *Balanus flosculus* (Darwin), *Chthamalus scabrosus* (Darwin) o mitilidos como *P. purpuratus* y *Semimytilus algosus* (Gould) (Castilla *et al.*, 1979; Moreno, 1988; DiSalvo, 1988).

c) Elementos del tipo de los polisacáridos, los que podrían estar formando parte, como

matrices extracelulares, de las cubiertas rocosas. Concebimos dos categorías: los proteoglicanos y los carragenanos. Al respecto, es interesante mencionar que recientemente se ha sugerido que proteoglicanos o glicoproteínas complejas de algas serían los inductores para el asentamiento de larvas de corales (Morse *et al.*, 1988).

En relación al último punto discutido, describiremos a continuación los primeros resultados obtenidos:

C) Sulfatación en larvas velíferas y proteoglicanos del "loco"

Existen una serie de antecedentes bibliográficos que sugieren que el sulfato ejercería efectos tanto en el comportamiento de invertebrados como en los niveles de síntesis de macromoléculas sulfatadas (Immers & Runstrom, 1965; Cambiazo & Inestrosa, 1990). En primer lugar evaluamos el efecto del sulfato en la movilidad de larvas velíferas. La Figura 7 muestra que las larvas expuestas a bajas concentraciones de sulfato ($125 \mu\text{M}$), por 12 horas, disminuyen significativamente su movilidad natatoria, medida en perímetros de 0,5 y 3,0 cm con respecto a larvas mantenidas en agua de mar a concentraciones de sulfato normales (25 mM). A continuación se estudió si el sulfato tenía efecto tanto en la síntesis de proteínas como en la de macromoléculas sulfatadas. Para esto se incubaron larvas velíferas a diferentes concentraciones de sulfato en presencia de S^{35} -metionina o de $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$. Como se observa en la Figura 8, el sulfato estimula hasta 35 veces la incorporación de sulfato radiactivo a macromoléculas que corresponden a proteoglicanos, mientras que la incorporación de metionina a las proteínas aumenta sólo 1,5 veces. Actualmente estamos evaluando la posibilidad que la estimulación de la incorporación de sulfato pueda corresponder ya sea a una mayor síntesis de proteoglicanos, o bien, a un aumento en el grado de sulfatación de estas macromoléculas. El inserto de la Figura 8 muestra que el selenato de sodio, un inhibidor de la síntesis de proteoglicanos (Dietrich *et al.*, 1987), produce una disminución en la incorporación de sulfato a macromoléculas. El efecto de este inhibidor sobre la movilidad larval está siendo actualmente evaluado.

Más del 90% del sulfato radiactivo está asociado a macromoléculas de la matriz extracelular de la larva velígera (Brandan *et al.*, 1989). Por lo tanto, para evaluar el tipo de

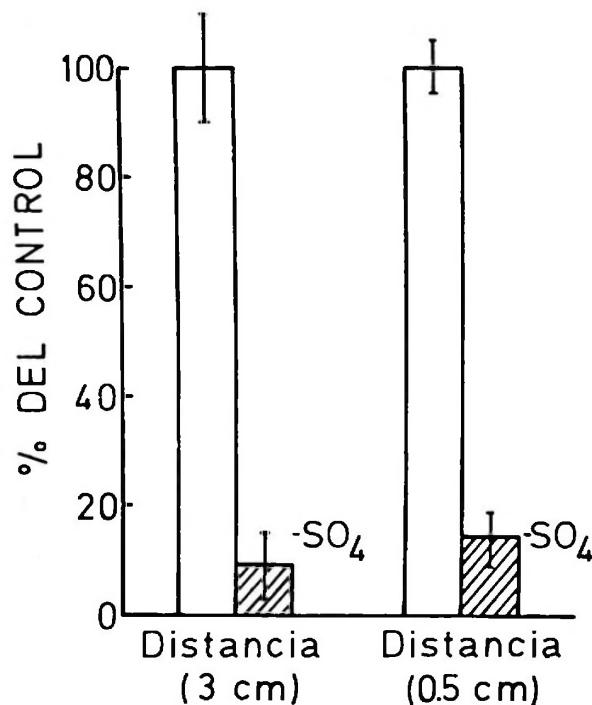


Figura 7. Efecto del sulfato en la movilidad natatoria de larvas veligeras de "loco". Entre 100-200 larvas veligeras de *C. concholepas* se incubaron, por períodos de 6-12 horas, en agua de mar artificial 0.025 M sulfato o 125 μ M sulfato a 18°C. Terminada la incubación las larvas fueron transferidas al centro de una placa Petri (10 cm), la cual contenía 35 ml de los medios de incubación antes mencionados. Al cabo de 10 min, se determinó en duplicado el número de larvas que habían recorrido la distancia de 0,5 y 3,0 cm, respectivamente. En la figura se muestran los resultados de 3 experimentos diferentes (media \pm es).

macromoléculas en las cuales se produce la mayor incorporación, la matriz fue solubilizada en guanidina-HCl 4 M y las macromoléculas sulfatadas fueron separadas en una columna de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) mediante un gradiente de NaCl de 0,2 a 1,2 M. La Figura 9a muestra que el material sulfatado puede ser fraccionado en dos máximos, que eluyen a concentraciones de NaCl de 0,7 y 0,9 M, respectivamente. Un tercer máximo se obtuvo con NaCl 3 M. Cada uno de estos máximos fue luego fraccionado, para separar las macromoléculas por tamaño, en una columna de filtración (Sephacrose CL-4B). La Figura 9b muestra el perfil de elución de las fracciones. Los máximos I y II están formados por dos especies moleculares con K_{av} de 0,09 y 0,15, respectivamente, mientras que el máximo III sólo está formado por la especie de mayor peso molecular.

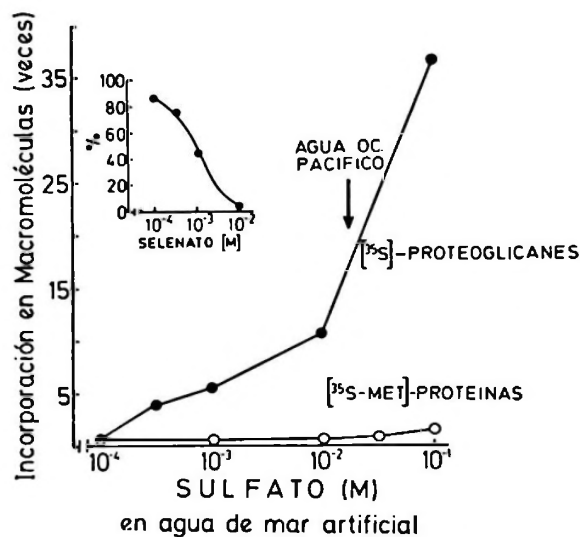


Figura 8. Efecto de sulfato libre en la síntesis de proteoglicanos y proteínas en larvas veligeras de "loco". Larvas veligeras se incubaron en agua de mar artificial a la concentración indicada de sulfato durante 3 horas a 16°C. Al inicio de las incubaciones se agregó Na₂S³⁵O₄ o S³⁵-metionina evaluándose su incorporación en proteoglicanos y proteínas, respectivamente. Cuando las larvas se incubaron en presencia de sulfato 0,1 M, se detectó un aumento de 35 veces en la incorporación de sulfato a proteoglicanos. En contraste, en la incorporación de metionina a las proteínas, se observó sólo un aumento de 1,5 veces. El recuadro muestra la inhibición por selenato de sodio de la incorporación de sulfato radiactivo a proteoglicanos.

D) La epidermis del pie de reclutas de *C. concholepas*

Dado que el epitelio de los velos larvales poseerían las células sensoriales que estarían involucradas en el reconocimiento de los sitios de asentamiento, hemos iniciado, también, un estudio ultraestructural de aquellos epitelios que pudieran permitirnos la identificación de las células sensoriales en *C. concholepas*. Con este objeto se describe a continuación la epidermis del pie de reclutas de "loco".

La epidermis de los moluscos está formada por una capa de células que reposa en una membrana basal, la que es seguida por una capa de tejido conectivo (Simkiss, 1988). Además de las células epidérmicas, ciliadas y glandulares, existen células neuroendocrinas y sensoriales de gran importancia en los procesos de interacción con el medio ambiente, especialmente con el sustrato del bento marino (Joose & Geraerts, 1983; Bubel, 1984). El pie del "loco" consiste, principal-

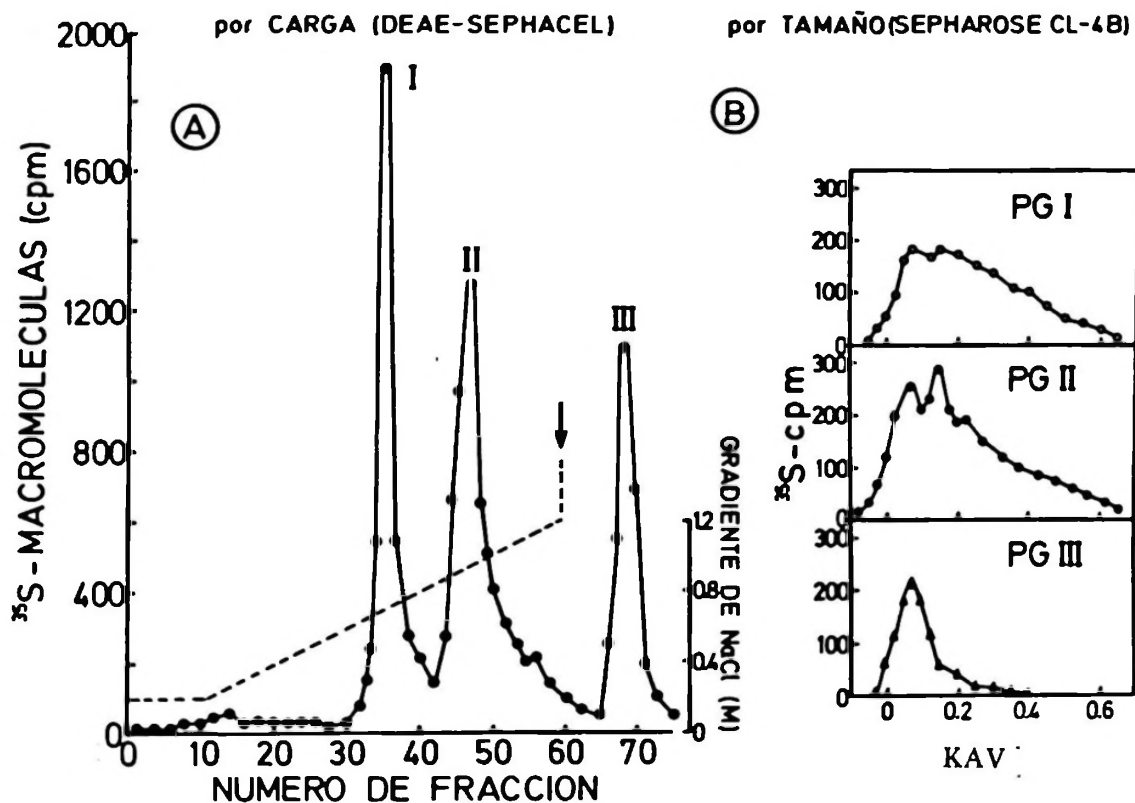


Figura 9. Fraccionamiento de proteoglicanos provenientes de velígeras de "loco". A. Fracción insoluble preparada de larvas velígeras preincubadas con sulfato radiactivo. El material insoluble fue disuelto en sales de guanidina y fraccionado en una columna de DEAE-Sephacel. El material unido se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0,2-1,2 M y posteriormente se aplicó NaCl 3 M, el cual eluyó un tercer peak. B. El material radiactivo correspondiente a los peaks I, II y III fue concentrado y fraccionado por tamaño en una columna de Sepharose CL-4B. Se observa que el peak I y II está formado por dos poblaciones de proteoglicanos de diferente tamaño, K_{av} 0,09 y 0,18. El peak III solamente contiene el de tamaño mayor. La recuperación de la radiactividad en la columna de DEAE-Sephacel fue de un 65-70%, mientras que en la Sepharose CL-4B fluctuó entre un 85 y 95%.

mente, en tejido muscular rodeado de una epidermis con escaso tejido conjuntivo subyacente. Existe una clara diferencia entre la epidermis lateral y la epidermis ventral del pie (Figura 10a); la epidermis lateral consiste en un epitelio cuboidal alto, rico en células cargadas de gránulos de color negro. La epidermis ventral, que se adhiere al sustrato, consiste en un epitelio cilíndrico ciliado (Figura 10b, c) formado por células muy altas, entre las que se distinguen claramente células mucosas cargadas de acúmulos gruesos de material que se tiñe pobremente con la tinción para glicoproteínas P.A.S., y muy intensamente con azul de Toluidina (pH 1,5) (Figura 10d). Lo usual es que grupos ácidos reactivos a este pH, correspondan a grupos sulfato de macromoléculas tipo glicosaminoglicanos (GAGs) (Pearse, 1960). Se observan además escasas células con una reacción sólo

P.A.S. positivas. Sobre la capa de cilios se encuentran restos de material P.A.S. positivo y azul de Toluidina también positivo, correspondiendo al mucus típico del pie de los gastrópodos (Grenon & Walker, 1980; Deyrup-Olsen *et al.*, 1983).

Al microscopio electrónico (Figura 11a, b) destacan células ciliadas, cuyos largos y numerosos cilios presentan cuerpos basales muy prominentes. En cortes transversales, los cilios presentan su ultraestructura característica (Figura 11c). Las células glandulares muestran un gran acúmulo de secreción, con material poco denso a los electrones, el que aparece llenando su citoplasma (Figura 11a). Estudios en progreso utilizando diversos marcadores neuronales, nos permitirán identificar las células sensoriales presentes en el pie de juveniles recién asentados.

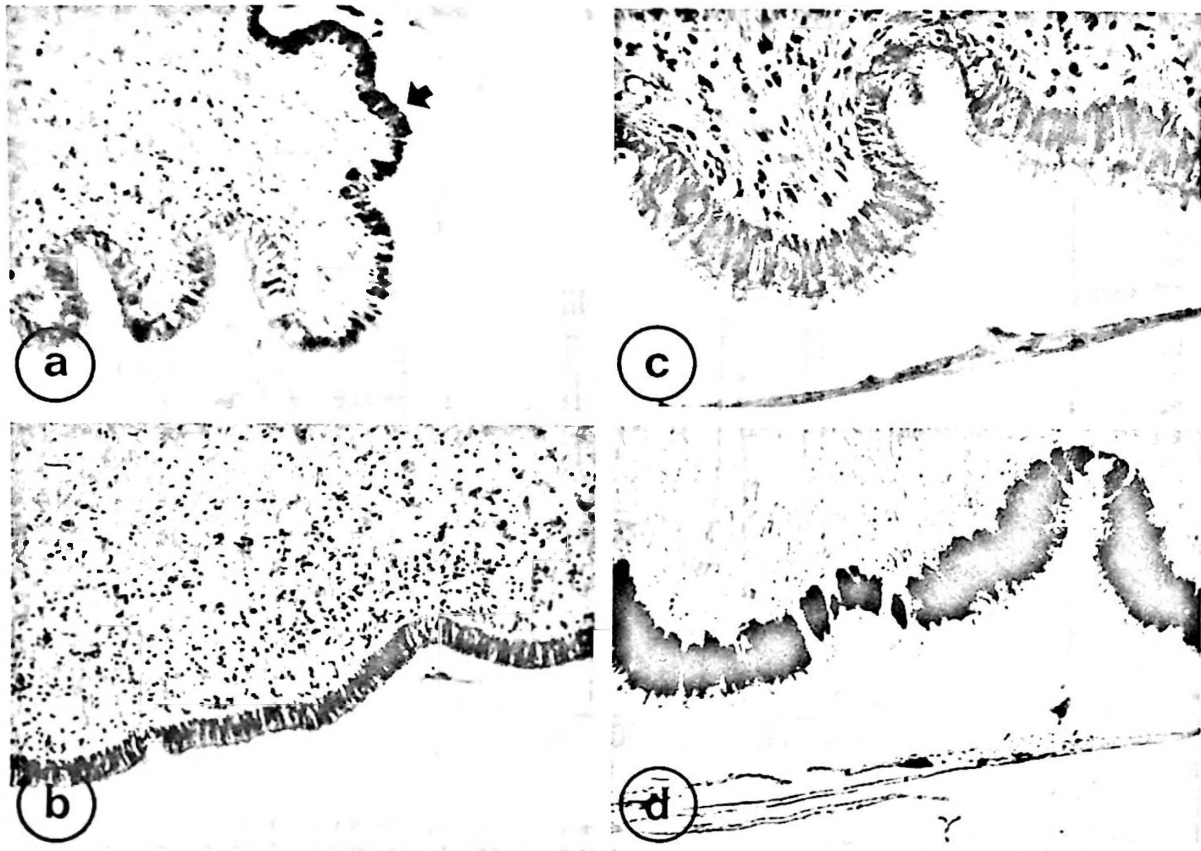


Figura 10. Epidermis y tejido muscular subyacente en pie del "loco", observadas al microscopio de luz en cortes de $6 \mu\text{m}$. a) Epidermis del borde lateral, rico en células con gránulos negros en su citoplasma (flecha) y epidermis del borde basal. Los repliegues de la superficie se deben a la contracción muscular inducida por la fijación, 250X. b) Epidermis del borde basal del pie, mostrando un epitelio ciliado, 250X. c-d) Epidermis del borde basal del pie. En c) destaca el epitelio rico en células ciliadas, 625X. En d) se observa la riqueza en células glandulares, que acumulan secreción teñida intensamente con azul de Toluidina (pH 1,5), 625X.

E) Clonamiento de secuencias del ADN del "loco" homólogas a una sonda para hormona de crecimiento humana

En general, una limitante importante en la relativamente baja eficiencia de la acuicultura de moluscos es el bajo aprovechamiento de los nutrientes, con altos costos de alimentación, crecimiento lento y una gran sensibilidad al trauma, estrés y enfermedades. En este contexto, el análisis de los requerimientos hormonales que permitan un crecimiento óptimo, una alta eficiencia nutricional y resistencia a problemas durante el cultivo, es una buena inversión del trabajo científico básico (Morse, 1984 b). A continuación se presentan nuestros estudios iniciales en la caracterización de la hormona de crecimiento en *C. concholepas*. Para realizarlo se preparó

una genoteca de ADN del "loco" y luego se utilizaron sondas para distintas hormonas, con el objeto de investigar si el ADN del "loco" poseía secuencias similares a las hormonas probadas.

El método utilizado para la purificación del ADN cromosomal de *C. concholepas* (Figura 12) resultó ser eficiente en términos de rendimiento, con mínima degradación de la molécula. Por otro lado, la ligación del ADN genómico al vector KS BlueScript fue efectiva en las condiciones ensayadas. Esto se puede observar en la Figura 13 carril b, donde se muestra que la banda correspondiente al vector desaparece luego de la ligación con el ADN del "loco", lo que indica la efectividad del proceso de ligación. La transformación de las células bacterianas permitió obtener cerca de 9.000 a 10.000 colonias por placa,

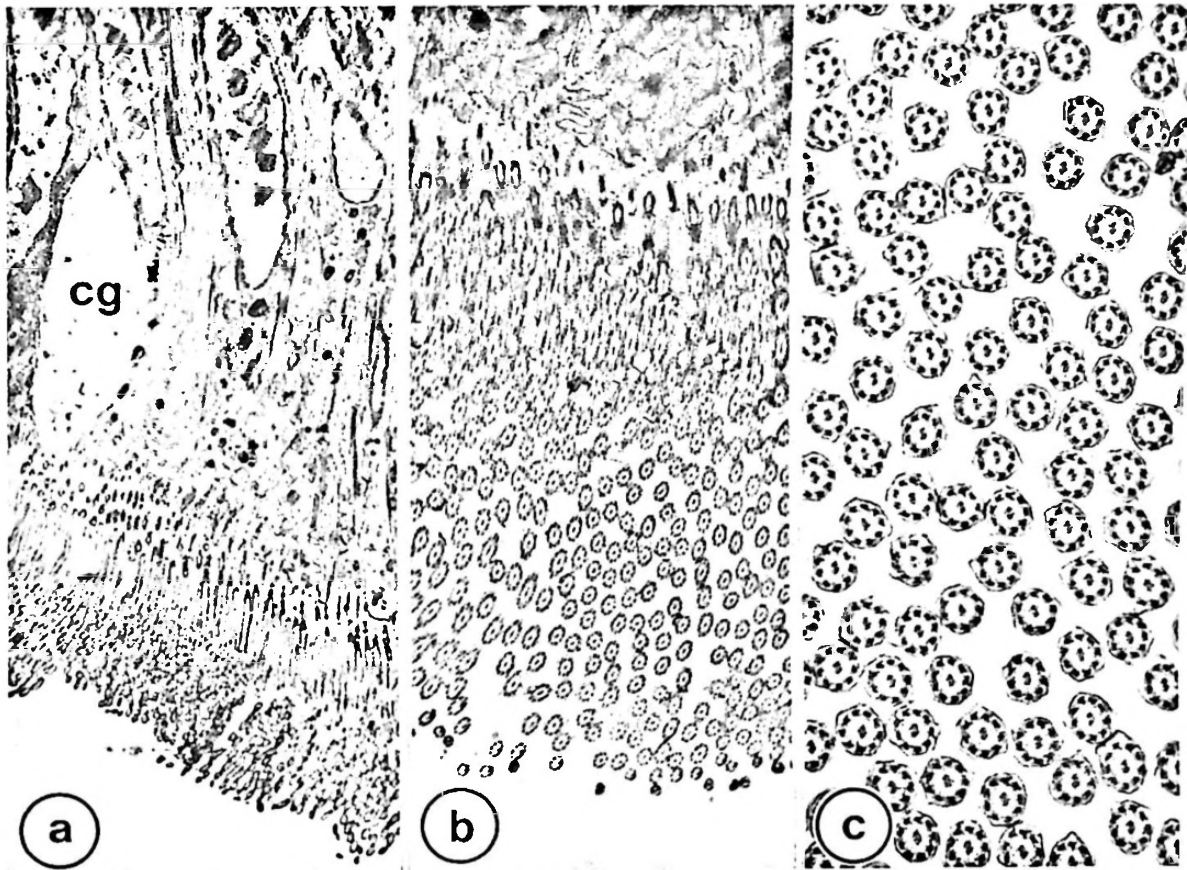


Figura 11. *Ultraestructura del epitelio de la epidermis, de carabasal (ventral) del pie del "loco".*
 a) Célula glandular (c.g.) con acúmulo de producto de secreción y células ciliadas, con pequeños gránulos de secreción en su citoplasma y núcleos basales, 1.500X. b) Borde luminal de las células ciliadas, 15.000X. c) Corte transversal por cilios, 40.000X.

donde un 90%, aproximadamente, resultaron ser recombinantes.

El análisis, por lisis alcalina, de las colonias recombinantes permitió comprobar que todas poseían insertos (datos no presentados). La hibridación de las colonias positivas con el fragmento de la hormona de crecimiento humana, marcada con alfa dCTP-(P³²), fue positiva en al menos tres de ellas. La Figura 14 muestra una placa con 3 de las colonias positivas. La extensión de este resultado ha permitido establecer que los fragmentos clonados del ADN genómico de *C. concholepas* presentan homología con la hormona de crecimiento humana. La extracción del plasmidio, y su posterior análisis por digestión con enzimas de restricción, permitió determinar el tamaño de los insertos, los cuales resultaron ser entre 1.100 a 1.350 pb (Inestrosa *et al.*, 1989).

DISCUSION

Los fenómenos moleculares que sustentan los sorprendentes cambios morfofuncionales que ocurren durante el desarrollo larval del "loco", no se conocen. Definir estos procesos nos ofrece la posibilidad de controlar instantes críticos del desarrollo y así llegar a producir cantidades importantes de semillas, tanto para iniciar cultivos artificiales como para el repoblamiento directo de zonas escogidas.

MARCADORES MOLECULARES DEL DESARROLLO

Polipéptidos larvales

Una de las características más conspicuas de cada una de las etapas del desarrollo temprano de organismos pluricelulares la consti-

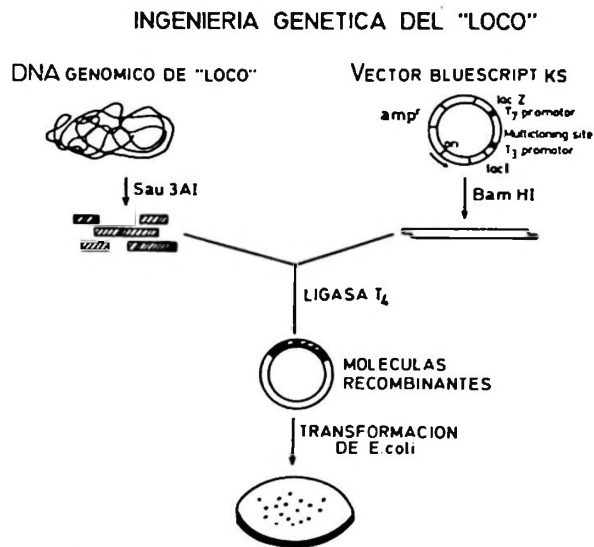


Figura 12. Esquema de la construcción de la genoteca de ADN cromosomal de *C. concholepas* usando el plasmidio BlueScript KS.

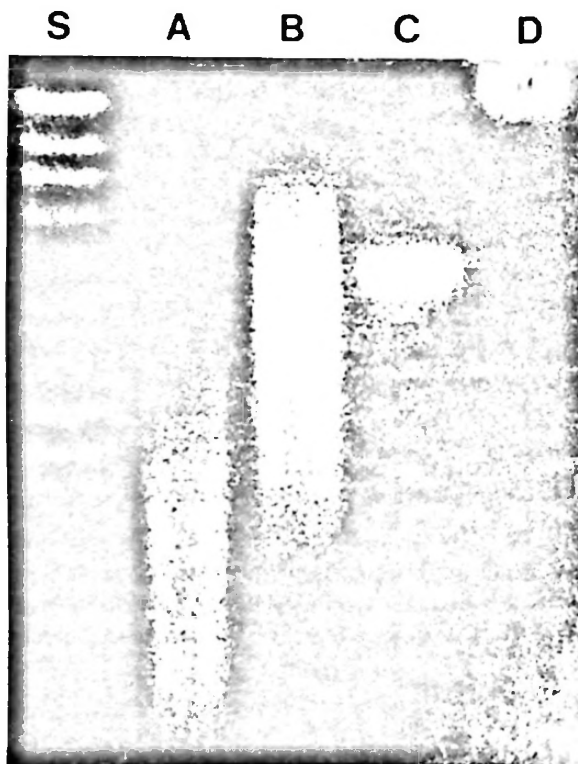


Figura 13. Análisis de la ligación del ADN genómico del "loco" digerido con Sau 3A I al vector BlueScript KS. Carril S muestra ADN del fago lambda digerido con Hind III y ADN del fago OX174 digerido con Hae III. Carril A, ADN de *C. concholepas* digerido con Sau 3A I antes de ligar. Carril B, ADN de *C. concholepas* digerido con Sau 3A I y ligado al vector BlueScript KS después de 16 horas de ligación. Carril C, vector KS digerido con Bam HI y desfosforilado. Carril D, ADN cromosomal de *C. concholepas*.

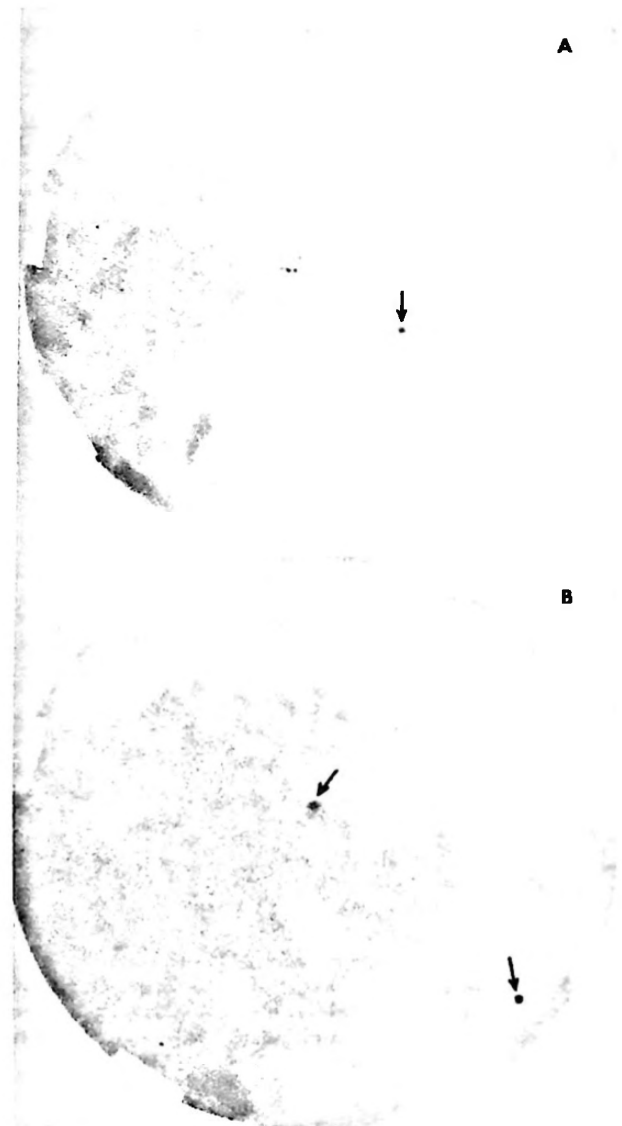


Figura 14. Autorradiografía de réplicas en filtros de nitrocelulosa de placas de bacterias recombinantes. En A y B se muestran clones positivos a una sonda de hormona de crecimiento marcada con alfa dCTP ³² de la genoteca de *C. concholepas*.

tuye la síntesis de proteínas, ARNs y otras macromoléculas informacionales. Se han efectuado estudios muy completos en invertebrados marinos, insectos y mamíferos, con el objeto de identificar moléculas que permitan definir etapas críticas del desarrollo de cada una de las especies estudiadas. En el caso del "loco", se han identificado las siguientes etapas en el interior de las cápsulas: huevos, pretrocóforas, trocóforas y larvas velíferas (Gallardo, 1973). Luego de la eclusión, se encuentran fundamentalmente larvas velíferas precompetentes. Estos cinco estadios son fáciles de reconocer morfológica-

mente y, por lo tanto, si se pudieran encontrar moléculas que específicamente se asocien a diferentes estados, se podría confeccionar un mapa molecular del desarrollo de este gastrópodo.

Las tres proteínas de alto peso molecular, 180, 119 y 111 kDa, identificadas en este trabajo, son macromoléculas a primera vista con características deseables para marcadores del desarrollo. En efecto, estas proteínas son abundantes hasta el estado de larva velígera intracapsular desapareciendo virtualmente a las dos semanas posteclosión, de tal manera que podrían servir como indicadores tempranos de larvas planctónicas. Estos polipéptidos no son sintetizados por el embrión, lo que se evidencia porque no incorporan S^{35} -metionina, lo que indica que se trataría de material de reserva para el desarrollo intracapsular y post-eclosión temprana. Por otro lado, al analizar embriones capsulares de *Nucella* y *Tais*, hemos detectado recientemente los mismos polipéptidos (datos no presentados), lo que indica que se trataría de material de reserva para larvas de gastrópodos presentes en el litoral.

La incorporación de P^{32} en polipéptidos constituye una poderosa herramienta para pesquisar proteínas que potencialmente puedan ser el blanco de inductores u hormonas. Así las cosas, si se tiene un polipéptido fosforilado esta modificación post-traduccional podría reflejar la presencia y acción de efectores y antagonistas específicos, lo que constituiría una indicación muy simple del efecto de inductores potenciales de cambios relacionados con asentamiento y metamorfosis. Cuando larvas en distintos estados pre y postcapsulares son incubadas en agua de mar normal conteniendo el isótopo, sólo un número discreto de polipéptidos incorpora la marca; así, es muy posible que cada estado pueda ser definido por un patrón de marcación muy sencillo. De nuestros resultados también emerge la conclusión general que tanto la fosforilación de polipéptidos como la síntesis de proteínas durante el desarrollo larval reflejan el correcto funcionamiento de los sistemas subcelulares respectivos, lo que garantiza la viabilidad y capacidad de embriones y larvas para estudios específicos de "funciones" larvales.

AChE

El desarrollo de la actividad de AChE denota, en principio, el inicio de la prolifera-

ción y diferenciación de las células ectodérmicas que originarían los sistemas colinérgicos (Gustafsson & Toneby, 1971). La actividad AChE aparece abruptamente en trocóforas, aumentando su actividad específica 3 veces con respecto a la actividad detectada en huevos y alcanzando un máximo (1.200 veces) en reclutas de 8 mm de longitud peristomal.

La actividad BuChE representa la mayor parte de la actividad enzimática de colinesterasa detectada en trocóforas y en larvas precompetentes. Esta actividad disminuye post-eclosión hasta alcanzar un mínimo en reclutas, mientras que la AChE aumenta concomitantemente. Considerando estos cambios, se puede evaluar la razón AChE/BuChE. Esta aumenta durante el desarrollo hasta alcanzar un valor alto en reclutas. El valor numérico de la razón podría servir para indicar un estado preciso del desarrollo pre y postcapsular, de tal forma que para valores menores que 1,0 las larvas tendrían una edad promedio de hasta 2 semanas posteclosión, y a tiempos posteriores el valor AChE/BuChE sería mayor que 1,0 (González *et al.*, 1989). Lo anterior permitiría definir un *Índice Colinérgico de Desarrollo Larval*. Estudios futuros en otros moluscos nos permitirán establecer la validez de este Índice para distintos bivalvos y gastrópodos.

La detección de la actividad de colinesterasa puede ser usada para indicar la diferenciación del tejido nervioso embrionario que debería empezar en trocóforas. De esta manera, realizando un estudio citoquímico, se podría conocer la distribución espacial de los elementos colinérgicos del sistema nervioso larval.

PROTEOGLICANES

Se ha demostrado que la presencia de iones sulfato es muy importante para el desarrollo y conducta normal de diferentes tipos de larvas de invertebrados (Immers & Runstrom, 1965; Cambiazo & Inestrosa, 1990). Embriones de equinodermos en el estado de blástula detienen su desarrollo cuando son incubados con inhibidores de sulfatación (Kinoshita & Saiga, 1979), o bien, la privación del sulfato exógeno produce distintos defectos morfológicos (Katow & Solursh, 1981). El efecto de la disminución del sulfato en la natación de larvas velígeras de "loco", fue dramático: larvas preincubadas en sulfato $125 \mu\text{M}$ disminuyeron considerablemente

su movimiento. Efectos comparables han sido observados en larvas de *Drosophila* crecidas en la presencia de beta-xilósidos, inhibidores de sulfatación (Cambiazio & Inestrosa, 1990). Para establecer las consecuencias de la carencia de sulfato se investigó la síntesis de macromoléculas sulfatadas y de proteínas. Se encontró que existe una estrecha relación de dependencia entre la incorporación de sulfato a macromoléculas sulfatadas y la concentración de sulfato en el medio. Se determinó que sulfato 0,1 M induce la incorporación de 35 veces más sulfato en larvas velíferas, mientras que sólo aumentó 1,5 veces la incorporación de S³⁵-metionina en proteínas. Estos resultados indican que el proceso de sulfatación estaría relacionado con la disponibilidad de sulfato en el medio, convirtiéndose este anión en un regulador de la movilidad. Esta observación puede ser de gran importancia en el estudio de los mecanismos de asentamiento de larvas competentes premetamórficas.

El aumento de la incorporación en sulfato se debería a un aumento en la sulfatación de macromoléculas preexistentes, o bien, a una síntesis exacerbada de éstas. Experimentos preliminares utilizando precursores radiactivos, glucosamina-H³ en conjunto con Na₂S³⁵O₄, sugieren que el aumento observado sería un reflejo de una mayor sulfatación de macromoléculas preexistentes. Esto puede explicarse por el aumento de las enzimas responsables de la sulfatación, sulfotransferasas (Brandan & Hirschberg, 1988), o bien, por una mayor disponibilidad de la molécula donante del sulfato, el fosfoadenosulfato (PAPS). Con respecto a esto, se ha sugerido que el aumento observado en la producción de GAGs en células endoteliales aórticas de bovino en medio con sulfato (Humphries et al., 1986), se debería a una afinidad diferencial de distintas sulfotransferasas por el PAPS. Sin embargo, en el caso de las larvas velíferas del "loco" no se observa una saturación del fenómeno de activación, lo cual reflejaría probablemente que el fenómeno observado podría estar mediado por otro mecanismo. El análisis de las macromoléculas sulfatadas en las larvas velíferas indica que éstas corresponden a macromoléculas polianiónicas de alto peso molecular. Estas macromoléculas son proteoglicanos formados por un esqueleto proteico y cadenas laterales de carbohidratos sulfatadas post-traduccionalmente. El tamaño molecular de estos proteoglicanos varía entre 1,5 a 3,0 × 10⁶.

Estas moléculas son de mayor tamaño a los encontrados en hígado, riñón o músculo de vertebrados (Oldber et al., 1979; Kanwar et al., 1984; Brandan & Inestrosa, 1987a), sin embargo, presentan un comportamiento similar en cuanto a su carga y perfiles cromatográficos en columnas de exclusión molecular. Estudios preliminares sugieren que la expresión de estos proteoglicanos durante el desarrollo sería diferencial, aumentando la sulfatación durante el desarrollo larval, i.e., mayor expresión en larvas velíferas que en trocóforas o blástulas.

La presencia de GAGs en otros invertebrados marinos se ha documentado claramente. Así, en moluscos del Atlántico Sur se encuentran GAGs similares a heparina (Cassaró & Dietrich, 1977; Dietrich et al., 1985). Recientemente, se ha sugerido que moléculas tipo polisacáridos complejos y proteoglicanos serían inductores morfogénicos de tres tipos de larvas de corales agaricidos: *Agaricia tenuifolia* (Dana); *A. agaricites humilis* (Verrill) y *A. agaricites danai* (Milne Edwards et Haime) (Morse et al., 1988). En este contexto, es muy interesante que se hayan aislado y parcialmente caracterizado proteoglicanos del alga roja, *Laurencia spectalis* (Court & Taylor, 1979), que forma parte del sustrato donde se asientan las larvas de los corales. Es también posible, así, que moléculas sulfatadas tipo GAGs o proteoglicanos puedan tener una función en fenómenos de inducción de asentamiento y metamorfosis en larvas "competentes" del "loco". Un aspecto importante a considerar es el hecho que los proteoglicanos formarían parte de la matriz donde se organiza la concha de los moluscos (Mann, 1988). Ellos participarían en el proceso de término de la cristalización inorgánica de esta matriz (Krampitz & Grazer, 1988). Durante el desarrollo intracapsular entre trocófora y velígera debe iniciarse la síntesis de los proteoglicanos específicos y este momento es probablemente muy crítico en la expresión del programa genético que origina la protoconcha y la teloncha. Existen algunas evidencias que sugieren que hay un mecanismo neuroendocrino de regulación de la formación de la concha de moluscos (Eyster & Morse, 1984), y de cumplirse esto, en el caso del "loco", se podría plantear la regulación de este momento para controlar esta primera etapa del desarrollo, obteniéndose así eclosión sincronizada y embriones de idéntica edad, dos condiciones para emprender con éxito cultivares. Los factores de crecimiento

no solamente serían importantes en el desarrollo y crecimiento de los distintos sistemas "blandos" del "loco", sino que además serían importantes en el proceso de biomineralización.

Hemos iniciado experimentos para determinar el instante preciso de aparición de las células que sintetizarían los proteoglicanos mediante citoquímica. Los primeros proteoglicanos sintetizados que participan en el inicio de formación de la protoconcha y la diferenciación de las células epiteliales secretoras serían parámetros que nos podrían entregar valiosa información sobre momentos críticos del desarrollo y diferenciación larvales.

DETECCION DE SECUENCIAS DE ADN DEL "LOCO" HOMOLOGAS A LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA

Los polipéptidos que forman la familia de hormonas y factores de crecimiento poseen secuencias homólogas entre sí (Moore *et al.*, 1982). Se ha establecido que el crecimiento y diferenciación de los sistemas celulares de organismos eucariotes dependen de un concierto de polipéptidos tales como: hormonas y factores de crecimiento (Heath & Rees, 1985; Levi-Montalcini, 1987). En 1923 se descubrió la existencia de una actividad tipo insulina en bivalvos, la que podría corresponder a un factor de crecimiento similar a la insulina (Collip, 1923). Recientemente se ha detectado la presencia de secuencias de ADN correspondientes a proteínas del tipo pre-proinsulina, denominadas MIP, en el sistema nervioso de *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 1988), lo que posibilita usar estos genes para producir factores de crecimiento por técnicas de ingeniería genética con el objeto de mejorar la utilización de nutrientes y acelerar la tasa de crecimiento tanto de larvas como de juveniles.

En primera instancia hemos usado una sonda que contiene la secuencia de la hormona de crecimiento humana, para establecer la presencia en el ADN del "loco", de una secuencia similar. Los clones que hibridaron con esta sonda contienen la secuencia de la hormona del crecimiento, ya que el vector KS BlueScript desaparece como tal de las mezclas de ligación y el ADN del "loco" digerido con enzimas de restricción cambia su

distribución cuando es analizado en geles de agarosa, luego de producida la ligación. La utilización de los factores de crecimiento del "loco" en conjunto con las técnicas de cultivo de este gastrópodo pueden convertir la acuicultura del "loco" en una verdadera actividad industrial, con un efecto multiplicador importante tanto en la empresa como en la investigación básica de invertebrados marinos. La experiencia japonesa de la acuicultura del awabe, *Haliotis discus*, usando sólo tecnologías empíricas adecuadas a la biología y desarrollo del organismo, sin utilizar el amplio espectro de técnicas discutidas aquí, resultan hoy en una industria económicamente muy interesante, cuyo monto anual es de US\$ 50 millones (Body, 1988). Considerando una evolución favorable en la demanda de la especie, es perfectamente razonable suponer que la industria del abalone se beneficiaría con la introducción de técnicas que facilitaren el manejo reduciendo costos operativos, e.g. conseguir tasas de crecimiento mayores. Al respecto, es interesante mencionar que el crecimiento de *Haliotis rufescens* puede ser significativamente acelerado, ya sea por inyección directa o por inclusión en la dieta de insulina y otras hormonas peptídicas de vertebrados (Morse, 1986).

Más aún, existe la posibilidad de insertar en la línea germinal de estos organismos los genes de factores de crecimiento, lo que se ha realizado en vertebrados e invertebrados con éxito variable (Palmiter *et al.*, 1982; Brinster & Palmiter, 1984; Mac Mahon *et al.*, 1984). En el marco de nuestro trabajo, es digno de destacar que estos organismos transgénicos pueden tener mayores tasas de crecimiento, acortando los tiempos de "crianza" y, en algunos casos, ser de mayor tamaño (Van Brunt, 1988). Esta tecnología no solamente se aplica a factores de crecimiento, sino que también a una gama muy variada de polipéptidos. Para el futuro será muy importante establecer si alguna de estas técnicas nos permitirán desarrollar organismos cuyos períodos larvales planctónicos sean más cortos, lo cual pronosticaría una gran eficiencia del proceso de cultivo controlado del "loco".

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la generosa ayuda de la Fundación Gildemeister, FONDECYT e IFS (A/1407-1).

LITERATURA CITADA

- ALLEN, JR. K.S. & S.L. DOWNING. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102: 197-208.
- BELTZ, G.A.; K.A. JACOBS; T.H. EICKBUCH; P.T. CHERBAS & F.C. KAFATOS. 1983. Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods. *Methods in Enzymology*. 100: 266-285.
- BALOUN, A.J. & D.E. MORSE. 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). *Biol. Bull.* (Woods Hole, Mass) 167: 124-138.
- BODY, A.G.C. 1988. Abalone culture in Japan. *Marine Fish. Rev.* 49: 75-76.
- BONNER, W.M. & R.A. LASKEY. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.
- BRANDAN, E. & N.C. INESTROSA. 1987a. Isolation of the heparan sulfate proteoglycans from the extracellular matrix of rat skeletal muscle. *J. Neurobiol.* 18(3): 271-282.
- BRANDAN, E. & N.C. INESTROSA. 1987b. Co-solubilization of asymmetric acetylcholinesterase and dermatan sulfate proteoglycan from the extracellular matrix of rat skeletal muscles. *FEBS Lett.* 213: 159-163.
- BRANDAN, E. & C. HIRSCHBERG. 1988. Purificación of rat liver N-Heparan-sulfate sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 263: 2417-2422.
- BRANDAN, E.; M. GONZÁLEZ & N.C. INESTROSA. 1989. Macromoléculas sulfatadas y la conducta de asentamiento en el "loco". Primer Congreso de Biotecnología de Chile. R27. Talca, enero 11-13.
- BRINSTER, R.L. & R.D. PALMITER. 1984. The transfer of new genes into mice. En: "Transfer and expression of Eucaryotic Genes", pp. 135-140. H.S. Grinsber & H.J. Vogel (eds.). Academic Press, New York, USA.
- BURKE, R.D. 1983. The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae: Stimulus and response. *Can. J. Zool.* 61: 1701-1719.
- BUBEL, A. 1984. Epidermal cells. En: *Biology of the Integument* 1:400-477. J. Bereiter-Hahn, A.G., Matlasy & K.S. Richards (eds.). Springer-Verlag, Berlin and New York.
- CAMBIAZO, V. & N.C. INESTROSA. 1989. Are the heparan sulfate proteoglycans of the *Drosophila* larvae extracellular matrix involved in locomotor behaviour? *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa).
- CASSARO, C.M.F. & C.P. DIETRICH. 1977. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J. Biol. Chem.* 252: 2254-2261.
- CASTILLA, J.C. 1976. A unique mollusc. *Sea Frontiers*. 22(5): 302-304.
- CASTILLA, J.C. 1983. El recurso *Concholepas concholepas*, su biología y estado en que se encuentra la pesquería en Chile. En: "Análisis de Pesquerías Chilenas", pp. 37-51, P. Arana (ed.) Univ. Católica Valpo.
- CASTILLA, J.C.; Ch. GUISTADO & J. CANGINO. 1979. Aspectos ecológicos y conductuales relacionados con la alimentación de *Concholepas concholepas* (Mollusca: Gastropoda: Muricidae). *Biol. Pesq.* 12: 99-114.
- CAVANAUGH, G.M. 1956. MBL. Formula 4. En: "Formula and Methods IV of Marine Biological Laboratory Chemical Room", pp. 67-68, G.M. Cavanaugh (ed.) The Marine Biol. Labs. Woods Hole, Mass. USA.
- COLWELL, R.R. 1983. Biotechnology in the Marine Sciences. *Science*. 222:19-24.
- COON, S.L.; D.B. BONARD & R.D. WEINER. 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and Catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94: 21-221.
- COURT, G.J. & I.E.P. TAYLOR. 1979. Isolation and partial characterization of a proteoglycan from the red alga, *Laurencia spectabilis*. *Phytochem* 18: 411-414.
- COLLIP, J.B. 1923. The demonstration of an insulin-like in the tissues of the clam (*Mya arenaris*). *J. Biol. Chem.* 55: xxxix-xxxxii.
- CRISP, D.J. 1984. Overview of research on marine invertebrate larval, 1940-1980. En: "Marine Biodeterioration", pp. 103-126. J.D. Costlow & R.C. Tipper (eds.), Naval Institute. Press, Annapolis, Maryland.
- DEYRUP-OLSEN, I.; D.L. LUCHEL & A.W. MARTIN. 1983. Components of mucus of terrestrial slugs (Gastropoda). *Am. J. Physiol.* 245, R448-R452.
- DIETRICH, C.P.; J.F. DEPAIVA; C.T. MORAES; H.K. TAKAHASHI; M.A. PORCIONATTO & H.B. NADER. 1985. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 843: 1-7.
- DIETRICH, C.P.; H.B. NADER; L. TOMA; P. DE AZAMBUJA & E.S. GARCIA. 1987. A relationship between the inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate synthesis and the inhibition of molting by selenate in the hemiptera *Rhodnius prolixus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146(2): 652-658.
- DISALVO, L.H. 1988. Observations on the larval and post-metamorphic life of *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789) in laboratory culture. *The Veliger*. 30: 358-368.
- ELLMAN, G.L.; K.D. COURTNEY; V. JR. ANDRES & R.M. FEATHERSTONE. 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- EYSTER, L.S. & M.P. MORSE. 1984. Early shell formation during molluscan embryogenesis, with new studies on the surf clam, *Spisula solidissima*. *Amer. Zool.* 24: 871-882.
- GALLARDO, C. 1973. Desarrollo intracapsular de *Concholepas concholepas* (Bruguière) (Gastropoda. Muricidae). Publicaciones Ocasionales N° 16. Museo Nacional de Historia Natural. Santiago de Chile. 16 pp.
- GONZÁLEZ, M.; A. PERELMAN; R. GONZÁLEZ-PLAZA & N.C. INESTROSA. 1989. Acetilcolinesterasa como posible marcador para evaluar competencia de veliger de "loco". Primer Congreso de Biotecnología de Chile. R28. Talca, enero 11-13.
- GRONON, J.F. & G. WALKER. 1980. Biochemical and rheological properties of the pedal mucus of the limpet *Patella vulgata* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 66B: 451-458.
- GRUNSTEIN, M. & D.S. HOGNESS. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3961-3965.
- GUSTAFSSON, T. & M.I. TONEBY. 1971. How genes control morphogenesis. *Am. Scien.* 59: 452-462.
- HADFIELD, M.G. 1984. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. *Aquaculture*. 39: 283-298.
- HANAHAN, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En: "DNA cloning. Vol. I. A Practical Approach", pp. 109-135. D.M. Glover (ed.). IRL Press. Oxford. Washington, D.C.

- HEATH, J.R. & A.R. REESE. 1982. Growth Factors in mammalian embryogenesis. En: "Growth Factors in Biology and Medicine". CIBA Found. Symp. 116: 3-22, The Bath Press, von, England.
- HIRATA, K.Y. & M.G. HADFIELD. 1986. The role of choline in metamorphic induction of *Phestilla* (Gastropoda, Nudibranchia). Comp. Biochem. Physiol. 84C: 15-21.
- HUMPHRIES, D.E.; C.K. SILBERT & J.E. SILBERT. 1986. Glycosaminoglycan production by bovine aortic endothelial cells cultured in sulfate depleted medium. 261: 912-9127.
- IMMERS, J. & J. RUNSTROM. 1965. Further studies of the effects of deprivation of sulfate on the early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. J. Embry. Exp. Morph. 14: 289-305.
- INESTROSA, N.C. 1986. La unión neuromuscular. Investig. & Ciencia (Scient. Amer., en español). 116: 8-17.
- INESTROSA, N.C. & B. MÉNDEZ. 1983. The A₁₂ acetylcholinesterase and polypeptide composition of the electric organ basal lamina of *Electrophorus* and some Torpedinidae fishes. Cell Biochem. & Function. 1: 41-48.
- INESTROSA, N.C. & G. RUIZ. 1985. Membrane-bound form of acetylcholinesterase activated during post-natal development of the rat somatosensory cortex. Develop. Neurosci. 7: 120-132.
- INESTROSA, N.C.; M-E. FUENTES; L. ANGLISTER; A.H. FUTERMAN & I. SILMAN. 1988. A membrane-associated dimer of the acetylcholinesterase from *Xenopus* skeletal muscles is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase *c*. Neurosci. Lett. 90: 186-190.
- INESTROSA, N.C.; E. CAMPOS; M. GONZÁLEZ & J.P. SÁNCHEZ. 1989. Secuencias de hormona de crecimiento en DNA de *C. concholepas*. Primer Congreso de Biotecnología de Chile. R27. Talca, enero 11-13.
- JOOSE, J. & W.P.M. GERAERTS. 1983. Endocrinology. En: "The Mollusca" 4: 318-406. A.S.M. Saleuddin & K.M. Wilburg (eds.). Academic Press, New York.
- KANWAR, Y.S.; A. VEIS; J.H. KIMURA & M.L. JAKUWOSKI. 1984. Characterization of heparin sulfate-proteoglycan of glomerular basement membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 762-766.
- KATO, T.; A.S. KUMAMIRENG; I. ICHINOSE; Y. Kitahara; Y. Kakinuma; M. Nishihira & M. KATO. 1975. Active component of *Sargassum tortile* effecting the settlement of swimming larvae of *Coryne uchidai*. Experimentia 31: 433-434.
- KATOW, H. & M. SOLURSH. 1981. Ultrastructural and time lapse studies of primary mesenchyme cell behavior in normal and sulfate-deprived sea-urchin embryos. Expl. Cell Res. 136: 233-245.
- KINOSHITA, S. & H. SAIGA. 1979. The role of proteoglycans in the development of sea urchins. Expl. Cell Res. 123: 229-236.
- KOENIG, C.; M. DABIKÉ & M. BRONFMAN. 1987. Quantitative subcellular study of apical pole membranes from chicken oxyntic cells in resting and HCl secretory state. J. Cell Biol. 105: 2945-2958.
- KRAMPIZ, G. & G. GRASER. 1988. Molecular mechanisms of biomineralization in the formation of calcified shells. Angew. Chem. 27: 1145-1156.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (Lond). 227: 680-685.
- LAWSON-KERR, C. & D.T. ANDERSON. 1978. Reproduction, spawning and development of starfish *Patiria exigua* (Lamarck). Aust. J. Mar. Freshwater Res. 29: 45-53.
- LEVI-MONTALCINI, R. 1987. Nobel Prize Lecture. The nerve growth factor: 35 years later. EMBO J. 6: 1145-1154.
- MAO MAHON, A.P.; C.N. FLYTZANIS; B.R. HOUGH-EVANS; K.S. KATULA; R.J. BRITTEN & E.H. DAVIDSON. 1984. Gene transfer in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. En: "Transfer and expression of eucaryotic genes". pp. 113-122. H.S. Ginsberg & H.J. Vogel (eds.). Academic Press, New York, USA.
- MANN, S. 1988. Molecular recognition in biomineralization. Nature (Lond) 332: 119-125.
- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH & J. SAMBROOK. 1982. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. USA.
- MORSE, D.E. 1984a. Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. Aquaculture 39: 263-282.
- MORSE, D.E. 1984b. Biochemical and genetic engineering in marine aquaculture: The role of modern biotechnology in the production of food from the oceans. Oceans '83, Mar. Tech. Soc., San Francisco 2: 1009-1011.
- MORSE, D.E. 1986. Biotechnology in Marine Aquaculture. Aquaculture Engineering 5: 347-355.
- MORSE, D.E. 1989. Trigger and amplifier pathways: Sensory receptors, transducers and molecular mechanisms controlling larval settlement adhesion and metamorphosis. En: "Marine Biodeterioration". R. Nagabhushnam & R. Turner (eds.). Oxford University Press, Delhi, India, en prensa.
- MORSE, D.E.; N. HOOKER; H. DUNCAN & L. JENSEN. 1979. Gamma-aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larval to settle and begin metamorphosis. Science 204: 407-410.
- MORSE, D.E.; N. HOOKER; A.N.C. MORSE & R.A. JENSEN. 1988. Control of larval metamorphosis and recruitment in sympatric agariciid corals. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 116: 193-217.
- MORENO, C.A. 1988. Experiencia de repoblación natural de locos en Mehuín. En "Seminario Recurso 'Loco'", CONICYT., Fundación Chile. 17-18 octubre.
- MORENO, C.A.; K. LUNECKE & M.I. LÓPEZ. 1986. The response of an intertidal *Concholepas concholepas* (Gastropoda) population to protection from man in southern Chile and the effects on benthic sessile assemblages. Oikos 46: 359-364.
- OLDBERG, A.; K. JELLEN & M. HOOK. 1979. Cell surface heparan sulfate. Isolation and characterization of a proteoglycan from rat liver membranes.
- PALMITER, R.D.; R.L. BRINSTER; R.E. HAMMER; M.E. TRUMBAUER; M.G. ROSENFELD; N.C. BIRNBERG & R.M. EVANS. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metalloprotein-growth hormone fusion genes. Nature (Lond) 300: 611-615.
- PAWLIK, J.R. & D.J. FAULKNER. 1986. Specific free fatty acids induce larval settlement and metamorphosis of the reef-building tube worm *Phragmatopoma californica* (Fewkes). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 02: 301-310.
- PEARSE, A.G.E. 1960. Histochemistry. Theoretical and Applied, pp. 228-288. Little Brown and Co., Boston.
- PECHENIK, J.A. & W.D. HEYMAN. 1987. Using KCl to determine size at competence for larval of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 112: 27-38.
- RIZZOLO, L.J.; J. FINIDORI; A. GONZÁLEZ; M. ARPIN; I. IVANOV; M. ADESNIK & D.D. SABATINI. 1987. Biosynthesis and intracellular sorting of growth hormo-

- ne viral envelope glycoprotein hybrids. *J. Cell. Biol.* 101: 1351-1362.
- RUIZ, G.; O. FLORES; R. GONZÁLEZ-PLAZA & N.C. INESTROSA. 1987. Effect of phenytoin on cytoskeletal protein phosphorylation and neuronal structure in the rat sensory cortex. *J. Neurosci. Res.* 18: 466-472.
- SEKI, T. & H. KAN-NO. 1981. Induced settlement of the Japanese abalone *Haliotis discus hannai* veliger by the mucous trails of the juvenile and adult abalones. *Bull. Tohoku Reg. Fish Res. Lab.* 43: 29-36.
- SIMKISS, K. 1988. Molluscan skin (excluding Cephalopods). En: "The Mollusca". 11: 11-35. E.R. Trueman & M.R. Clarke (eds.). Academic Press, New York.
- SMIT, A.B.; E. VREUGDENHIL; R.H.M. EBBERINK; W.P.M. GERRITS; J. KLEINBERG & J. LANGE. 1989. precursor of an insulin-related peptide. *Nature (Lond)* 331: 535-538.
- STUARDO, J. 1979. Sobre la clasificación, distribución y variación de *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789): un estudio de taxonomía Beta. *Biol. Pesq.* 12: 5-38.
- VALENZUELA, P. & B. MÉNDEZ. 1982. *Techniques in Molecular Genetics*. San Francisco, USA.
- VAN BRUNT, J. 1988. Molecular Farming: Transgenic animals as bioreactors. *Biotechnol.* 6: 1149-1154.
- YOOL, A.J.; S.M. GRAU; M.G. HADFIELD; R.A. JENSEN; D.A. MARKELL & D.E. MORSE. 1986. Excess potassium induced larval metamorphosis in four marine invertebrate species. *Biol. Bull. (Mond)* 111: 15-170.