

## LA SIMBIOSIS ALGAL EN *ELYSIA TIMIDA* RISSO 1818. PRIMEROS RESULTADOS\*

Joandomènec Ros\*\* y José Rodríguez\*\*

Recibido: enero 1985

### ABSTRACT

#### The algal symbiosis in *Elysia timida* Risso 1818. First results

Preliminary ecological, microstructural and metabolic results are presented of a study on the symbiotic relationship between the Saccoglossan Opisthobranch *Elysia timida*, from the Mar Menor hypersaline lagoon (Murcia, SE Spain), and its algal chloroplasts. The intimate metabolic relationship is demonstrated from different points of view and using different techniques: cytological study through electron microscopy; primary production of the chloroplasts through the measure of the produced oxygen and of the incorporated  $^{14}\text{C}$ , etc. Some data on the biology of the species in its lagoon habitats complete the paper, which closes with a consideration on the work to be still done on the subject.

### RESUMEN

Se presentan los primeros datos acerca de la simbiosis del opistobranquio sacogloso *Elysia timida*, relativamente abundante en la zona litoral del Mediterráneo ibérico y muy abundante en el Mar Menor (de donde proceden los individuos estudiados), con cloroplastos algales. La íntima relación metabólica de la simbiosis se demuestra desde diferentes enfoques y aplicando técnicas diversas: estudio citológico mediante microscopía electrónica; producción primaria de los cloroplastos a partir de la medida del oxígeno desprendido y del  $^{14}\text{C}$  fijado, etc. Los datos de metabolismo se acompañan de algunas consideraciones sobre la biología de la especie en el Mar Menor. y el artículo termina listando las grandes líneas de investigación que sobre el tema de la simbiosis cloroplasto-sacogloso siguen planteadas.

### INTRODUCCIÓN

En los moluscos opistobranquios Sacoglosos es general la simbiosis algal (véanse, entre otros, GREENE, 1970; TAYLOR, 1967; ROS, 1978), mediante la cual hay aparentemente producción de materia orgánica por parte de las algas (o cloroplastos) simbiotes y posterior cesión de la misma al molusco.

Una especie de sacogloso, *Elysia timida* Risso 1818, es común en las costas ibéricas (BALLESTEROS, 1979; ROS, 1981) y muy abundante en el Mar Menor (ROS, en prensa).

Dicha especie se ha estudiado para comprobar si seguía la norma, al parecer general, de las de su grupo. RAHAT & MONSELISE (1979) habían señalado ya la presencia de cloroplastos en ejemplares de esta especie de las costas mediterráneas de Israel, pero restaba demostrar que *E. timida* era capaz de realizar fotosíntesis, así como cuantificar la importancia metabólica de dicha relación simbiótica.

Los primeros trabajos que indican la presencia de cloroplastos en un opistobranquio (*Elysia viridis*) datan ya de un siglo (NEGRI & NEGRI, 1876); algunos años más tarde, BRANDT (1885)

\* Trabajo presentado como comunicación en el IV Simposio Ibérico de Estudios do Benthos Marinho (Lisboa, mayo de 1984).

\*\* Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia.

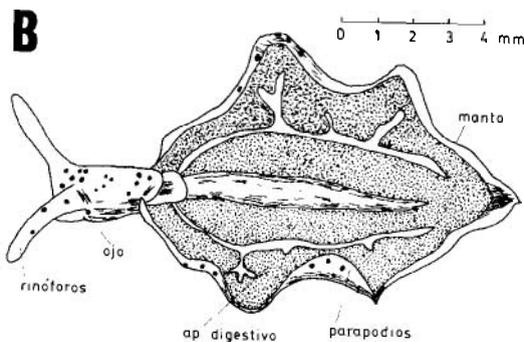
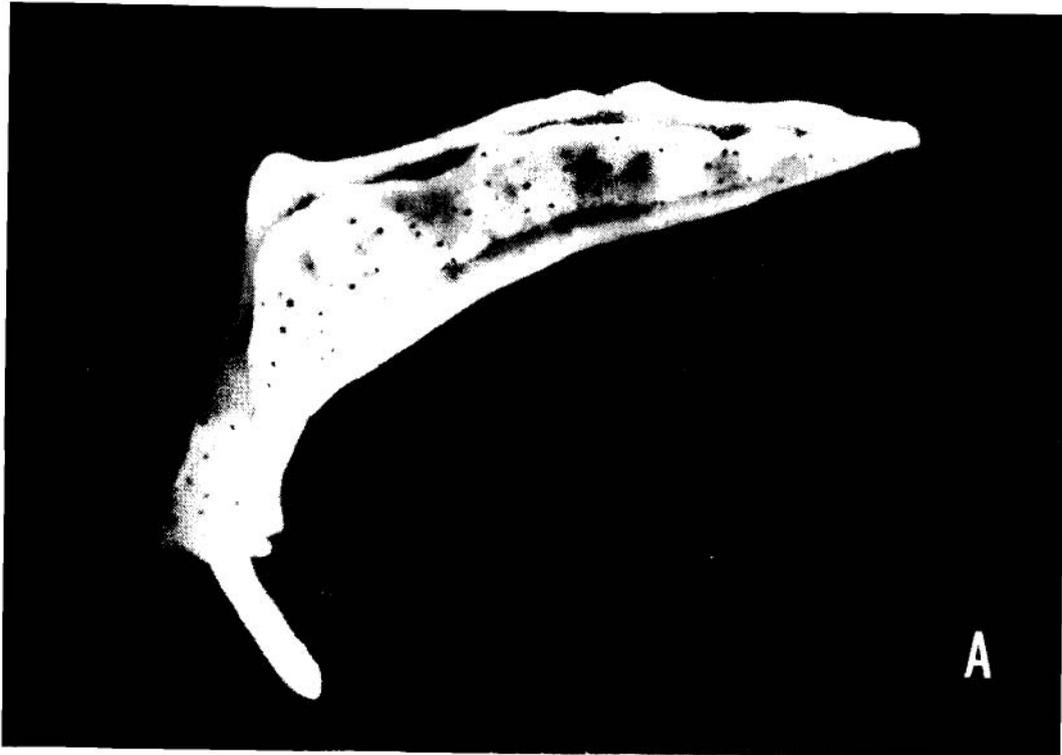


FIGURA 1. *Elysia timida* Kisso 1818. A. animal moviéndose sobre el fondo del acuario. Isla del Ciervo (Mar Menor), abril 1985. x10. B. dibujo de un individuo en reposo, con el cuerpo ligeramente encogido y los lóbulos parapodiales extendidos, que dejan ver las ramificaciones de la glándula digestiva sobre la parte interna de los parapodios. Las puntuaciones (a excepción de los ojos, situados en la base de los rinóforos) son manchas de color rojo; la parte interna de los parapodios (punteado) es de color verde intenso; el resto del cuerpo es blanco, en algunos ejemplares con un ligero tinte verdoso. Dibujado del natural.

*Elysia timida* Risso 1818. A. living animal crawling over the aquarium bottom. Isla del Ciervo (Mar Menor lagoon), april 1985. x10. B. drawing of a resting individual, with its body slightly shrunken and the parapodial lobes extended, showing the branching of the digestive gland on the inner part of parapodia. The dots (except for the eyes, located at the base of the rhinophores) are red coloured spots; the inner part of the parapodia (stippled) is bright green; the remaining of the body is white, in some specimens with a slight greenish hue. Drawn from nature.

separó orgánulos verdes del cuerpo de esta misma especie. NAVILLE (1926) descubrió zooxantelas intracelulares en el tracto digestivo del eolidáceo *Aeolidiella alderi*, y YONGE & NICHOLAS (1940) en el del sacogloso *Tndachia crispata*. Pero los estudios más importantes, y que marcan la pauta de trabajo en la investigación de la simbiosis alga-epistobranquio, han sido los de KAWAGUTI &

YAMASU (1963). TAYLOR (1967). GREENE & MUSCATINE (1970). TRENCH (1970) y otros posteriores de estos y otros autores, en cada uno de los cuales se describen nuevas especies con la capacidad anteriormente citada.

Aquí se exponen los resultados preliminares de un estudio más amplio sobre la ultraestructura y el funcionalismo de cloroplastos algales en *Elysia timida*, y su papel en la ecología de la

especie. La investigación se planteó con el fin de:

- a) evaluar la importancia de las poblaciones de *E. timida* en el Mar Menor;
- b) comprobar el tipo de alimentación y las especies algales consumidas;
- c) comprobar si los individuos de las poblaciones estudiadas poseían cloroplastos algales;
- d) averiguar, en su caso, la procedencia de dichos cloroplastos y si eran funcionales, evaluando asimismo su actividad fotosintética;
- e) caracterizar los fotosintetatos y seguir la ruta metabólica de los mismos y su destino;
- f) evaluar el papel de la simbiosis en la biología del sacogloso.

Aquí se presentan básicamente los resultados correspondientes a los cuatro primeros apartados citados (que, sin embargo, no se han desarrollado en toda su extensión); se considera que, aunque formando parte de un todo todavía incompleto, son merecedores por sí mismos de difusión y comentario.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La descripción de *Elysia timida* puede hallarse en SWENNEN (1961), BALLESTEROS (1979, 1980) y BUCHEI (1984), así como en textos anteriores. Se trata de un elisiáceo típico, limaciforme, de 5 a 15 mm de longitud, de color blanquecino con punteaduras rojas y con la cavidad paleal de intenso color verde (fig. 1). Las poblaciones de *E. timida* suelen ser numerosas, tanto en el Mar Menor, de donde proceden los ejemplares estudiados, como en aguas litorales plenamente marinas de Baleares (BALLESTEROS, 1980; ROS, 1981 y observaciones no publicadas en Cala Ratjada, Mallorca) y de las costas mediterráneas peninsulares (Tarragona, Alicante, Murcia; BALLESTEROS, 1980, y observaciones propias no publicadas). Estas poblaciones se encuentran siempre en aguas someras (0.2-1.5 m), por lo general asociadas al alga clorofícea *Acetabularia acetabulum*. BALLESTEROS (1979), BUCHEI (1984) y observaciones propias no publicadas (Cala Ratjada, Mallorca) señalan una asociación semejante con el alga feofícea *Padina pavonica*.

El Mar Menor es una laguna litoral situada en el SE de la Región Murciana, casi incomunicada con el Mediterráneo, lo que hace, junto con la termicidad del clima y el reducido aporte pluviométrico y casi nulo fluvial, que tenga unas condiciones muy especiales de salinidad y temperatura (Ros, en prensa). Si para algunas especies ello supone una eficaz barrera ecológica, para otras (euritermas y eurihalinas) la habitabilidad es óptima, y se presentan en poblaciones numerosas, como es general en muchas especies propias de ambientes rigurosos. La salinidad de las aguas, del 44-46‰, contrasta mucho con los valores normales del Mediterráneo vecino (37‰); la oscilación térmica es también notable, así como los máximos alcanzados, y en la época en que se ha realizado el estudio (junio 1983-mayo 1984) las temperaturas variaron desde los 10-11°C en invierno hasta los 26-28°C en verano (temperaturas a 0.5 y 0 m).

Se han elegido siete estaciones de muestreo, distri-

buidas a lo largo de todo el litoral del Mar Menor (fig. 2); son: 1) Molino de la Calcetera; 2) Ciudad del Aire; 3) Boca Rambla; 4) Playa Honda; 5) Isla del Ciervo; 6) Playa de las Brisas (N), y 7) Playa de las Brisas (S). No se ha pretendido hacer un estudio exhaustivo de la distribución de la especie en la zona, por lo que el método de muestreo se ha limitado a obtener valores relativos referidos a número de individuos recolectados por unidad de esfuerzo, como estima de la abundancia de la especie en el Mar Menor. Dicha unidad de esfuerzo era de cinco minutos de recolección en buceo a pulmón libre. Se estima que este tiempo permite la prospección minuciosa de aproximadamente 1 m' de fondo somero, con lo que es posible referir los datos de abundancia a superficie muestreada (densidad).

En cuanto a la alimentación, se han realizado extractos de pigmentos (véase metodología sumaria en ROS, 1979) de los animales y de las algas que se encuentran en los hábitats en que éstos aparecen. Se han obtenido espectros continuos de absorción (con un espectrofotómetro SHIMADZU GRAPHICORD-UV-240) de dichos pigmentos para *Acetabularia acetabulum* y *Elysia timida*, con el fin de comparar los espectros y, en una primera aproximación, establecer, en su caso, su identidad.

Posteriormente, para confirmar la presencia en *Elysia timida* de orgánulos capaces de realizar fotosíntesis, en concreto cloroplastos, se realizaron estudios ultraestructurales. Para ello, y siguiendo lo indicado en KAWAGUCHI & YAMASU (1965), GREENE (1972), GRAVES *et al.* (1979), etc., se cortaban animales vivos en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm' de volumen, tras lo cual se procedía a una prefijación de las muestras en glutaraldehído al 2% y a una postfijación con tetróxido de osmio al 2%. Más tarde se realizó un contrastado con acetato de uranilo al 2% en tampón veronal; inmediatamente después del contrastado se efectuaba una deshidratación con una serie de alcoholes de graduación ascendente hasta llegar al alcohol absoluto. Tras someter el material a diversos baños de agente intermediario (óxido de propileno) y Epon, se procedía a la confección de los bloques, utilizando cápsulas de gelatina. La polimerización se llevaba a cabo durante tres días a 60°C. El control de los cortes semifinos con azul de metileno permite localizar los cloroplastos y seleccionar el área que deberá repiramidarse para obtener los cortes ultrafinos. Tras el doble contrastado rutinario con acetato de uranilo y citrato de plomo se procedía a la observación de las rejillas con un microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM 10C, trabajando casi siempre a 60 Kv.

En cuanto al estudio fisiológico, para demostrar que se realizaba fotosíntesis se empleó una doble metodología. Por un lado, se midieron las variaciones de oxígeno en muestras de agua donde estuvieran inmersos un cierto número de animales durante un determinado período de tiempo y a la luz; paralelamente, se midió la fijación de carbono marcado radiactivamente después de un período dado de incubación en condiciones semejantes.

Para estimar el desprendimiento de oxígeno se empleó el método de Winkler (véase ROS, 1979; PARSONS *et al.*, 1984), midiendo paralelamente en tres botellas de 250 ml, una transparente a la luz, y n animales, y

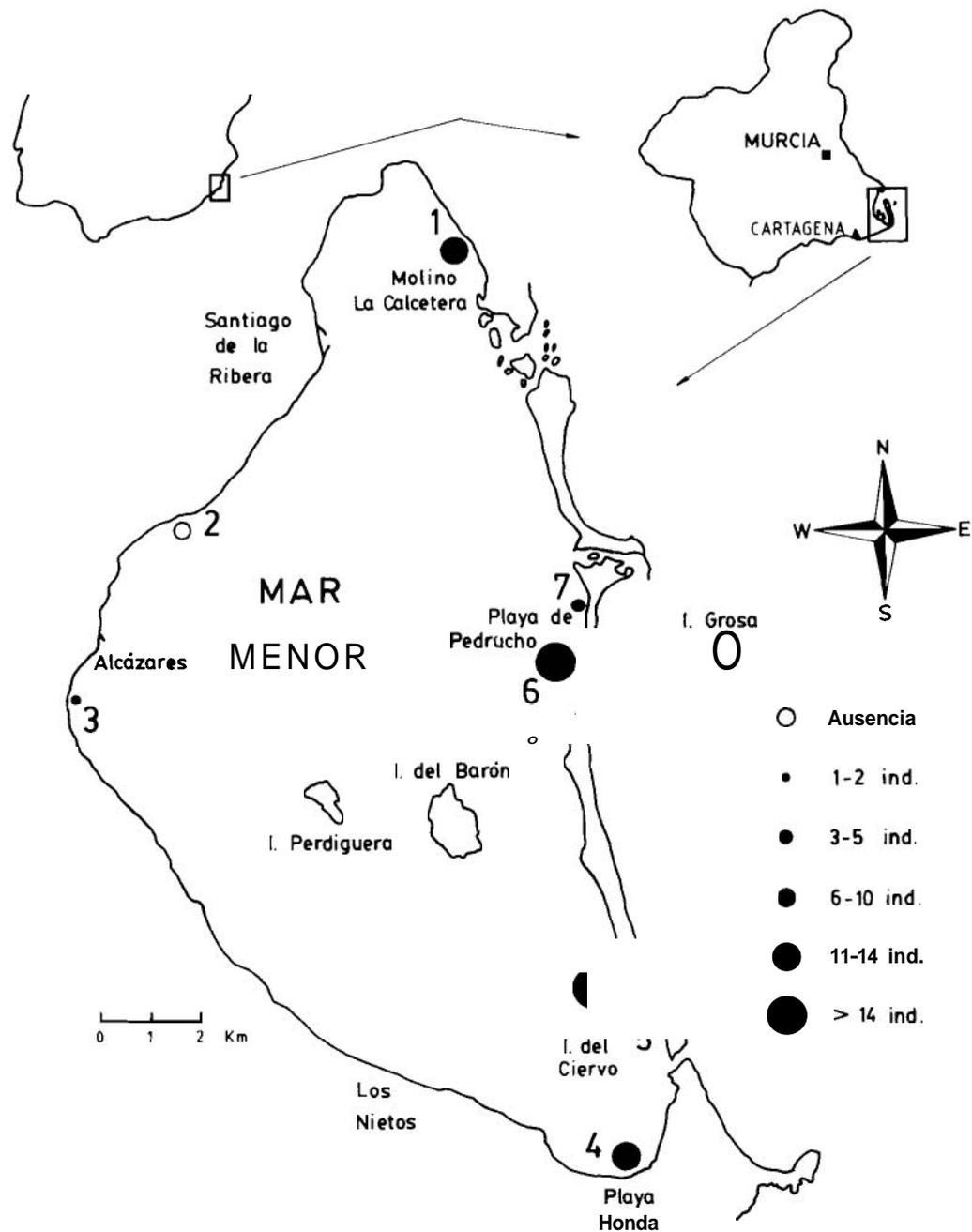


FIGURA 2. Distribución y densidad de *Elysia timida* en las estaciones de muestreo del Mar Menor. Los símbolos indican número de individuos por unidad de esfuerzo (cinco minutos de muestreo; véase texto), aproximadamente igual a ind./m<sup>2</sup> (medias anuales).

Distribution and density of *Elysia timida* in the Mar Menor sampling stations. The symbols mean number of individuals per effort unit (five minutes of sampling; see text), which is roughly equal to individuals per square meter (yearly means).

otras dos con animales. una transparente y otra opaca. la cantidad de oxígeno después de un período de incubación de 90 a 180 minutos. a 15-20° C de temperatura ambiente. El oxígeno medido en la botella oscura da una estima de la respiración de los animales. y el de la clara el producido por fotosíntesis menos el consumido en la respiración; finalmente, el oxígeno en la botella sin animales da el valor de partida. El agua de las botellas se filtraba previamente a través de filtros de fibra de vidrio de 0.8 micras de poro. para evitar las posibles interacciones que sobre el oxígeno disuelto en el agua de mar pudieran ejercer tanto el fito como el zooplancton. El número de *E. timida* utilizado en cada botella oscilaba entre 8 y 12. y los resultados se refenan a g (peso seco) de sacogoso y a hora de incubación.

La medición de la incorporación de carbono marcado se hizo mediante el uso de  $^{14}\text{CO}_2$  (STEEMAN-NIELSEN, 1952; MARGALEF, 1967; ROS, 1979; PARSONS *et al.*, 1984). Tras filtrar el agua como antes se ha indicado. se inyectaba en la misma 1 ml de una solución de bicarbonato sódico radiactivo con una actividad de 4 microcuries/ml. Tras dos horas de incubación. en viales claro y oscuro de 4 ml y a temperaturas ambientes entre 15 y 20° C. se procedía a la eliminación de las clorofilas (que pueden dar una lectura errónea, por ser coloreadas) mediante extracciones con metanol. Seguidamente se procedía a la digestión química de los 3 animales usados en cada botella con sulfato amónico a 100°C durante una hora. y más tarde con hidróxido potásico a la misma temperatura, hasta la disolución completa del animal (FREIFELDER, 1979; GREENE & MUSCATINE, 1970). Para finalizar se añadía cóctel de centelleo y se acidificaba la muestra. para que el  $^{14}\text{C}$  no fijado, es decir. el que permanecía en forma inorgánica, pasara a dióxido de carbono al bajar el pH y no interfiriera así en el recuento (CPM); el contador de centelleo utilizado fue un LKB-WALLAC 1217 RACKBETA.

El cálculo se basa en la conocida relación entre la radiactividad añadida (que se conoce), la fijada por los cloroplastos (que es la que indica el contador de centelleo). el carbono inorgánico presente en el agua (deducible a partir de la alcalinidad) y el carbono total fijado:

$$\frac{^{14}\text{C fijado}}{^{14}\text{C añadido}} = \frac{\text{C total fijado}}{\text{C total disponible}}$$

(Para más detalles. véanse las referencias citadas.)

## RESULTADOS

### a) BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE *E. TIMIDA*

En la figura 2 se han dispuesto los datos referidos a distribución y abundancia media anual de *Elysia timida* en el Mar Menor. a partir del recuento del número de individuos por unidad de esfuerzo. Se trata de una primera estima de aquellas zonas en las que el gasterópodo era más abundante. Las características ambientales de tales zonas son: poca profundidad. iluminación elevada (*E. timida* falta o es escasa en ambientes ligeramente esciáfilos) y sustrato cons-

tituído por arenas gruesas o piedras con *Acetabularia acetabulum*, así como otras algas propias de la zona (infralitoral superior; PÉREZ, 1983). No se ha tenido en cuenta la distribución estacional; los animales se hallan presentes a lo largo de todo el año, pero son más abundantes en la primavera, a principios de la cual el tamaño medio de los individuos es menor.

En la figura 3 se comparan dos espectros de absorción de extractos metanólicos de los pigmentos de *E. timida* y *A. acetabulum*; la identidad cualitativa de las curvas pigmentarias indica claramente la relación trófica entre el sacogoso y la clorofícea. Asimismo, de la misma figura puede deducirse que los pigmentos. a pesar de haber sido ya ingeridos por el animal. aún no estaban degradados, lo que puede indicar que todavía eran capaces de realizar la fotosíntesis.

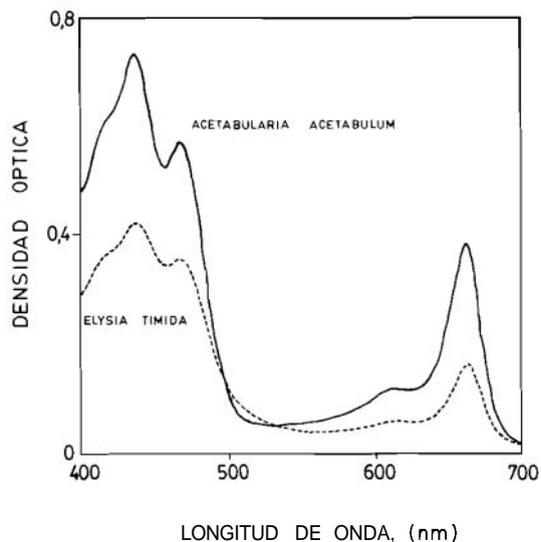


FIGURA 3 Espectros de absorción de pigmentos de *Acetabularia acetabulum* y de *Elysia timida*.

Absorption spectra for *Acetabularia acetabulum* and *Elysia timida* pigments.

### b) MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Como se observa en las figuras 4 a 7. la presencia de cloroplastos en los tejidos del animal es evidente. Dichos orgánulos vegetales presentan su ultraestructura típica, con los apilamientos tilacoidales formando granas, inmersos en el estroma del cloroplasto; su tamaño normal oscila entre 2 y 7 micras. Son. además, enor-

FIGURA 4. Microelectrografía del tracto digestivo de *E. rimida*. En esta figura y las siguientes la clave de símbolos es: C. cloroplastos; G. granas; L. lisosomas; N. núcleo; P. pirenoides; R. retículo endoplasmático rugoso; V. microvillis. Escala en micras.

Electromicrography of the digestive tract of *E. timida*. In this and the following illustrations the symbol key is: C. chloroplasts; G. grana; L. lysosomes; N. nucleus; P. pyrenoids; R. rough endoplasmic reticulum; V. microvilli. Scale bar in microns.

memente abundantes y fácilmente observables; llama la atención la importante cantidad de almidón (pirenoides) que contienen. Como se deduce de la observación de las microelectrográficas, los cloroplastos están localizados en células del epitelio digestivo del molusco, pues se observan claramente los microvillis de los enterocitos. La abundancia relativa de estos orgánulos por muestra observada disminuía conforme aumentaba el tiempo de cautividad (en ayunas) del animal, lo que no es evidente en las microelectrográficas. Finalmente, se observa también en éstas el núcleo de las células epiteliales, el retículo endoplasmático rugoso y lisosomas, entre otros orgánulos celulares.

### c) FOTOSÍNTESIS

Los resultados de las experiencias de producción de oxígeno (fig. 8) indican claramente que en *Elysia timida* hay fotosíntesis a la luz. Esta producción de oxígeno es más intensa (alrededor de los  $40 \text{ ml O}_2 \cdot \text{g (p.s.)}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ ) cuanto más cercana se realiza su medición a la fecha de recolección del animal. En la misma figura puede verse que a las dos semanas de la recolección, y de ser mantenido en acuario sin *Acetabularia*, el molusco produce muy poco oxígeno (10 ml). Estos valores corresponden a producción neta; la respiración de los moluscos oscilaba entre 3 y  $7 \text{ ml O}_2 \cdot \text{g (p.s.)}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ , en función de la temperatura ambiente (no se advirtió ninguna variación en función del tamaño de los animales). Cuando la fotosíntesis se midió como fijación de carbono orgánico, mediante el método del carbonato radiactivo, resultó existir asimismo una clara fijación ( $35 \text{ ml CO}_2 \cdot \text{g (p.s.)}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ ). Además, las proporciones en las que el carbono se incorpora al cloroplasto simbiote son, mol a mol, casi exactamente las mismas que las de producción de oxígeno (fig. 9). Se observa igualmente un decrecimiento de la producción primaria (como fijación de  $\text{CO}_2$ ) en función del tiempo de permanencia de los sacoglosos en cautividad.

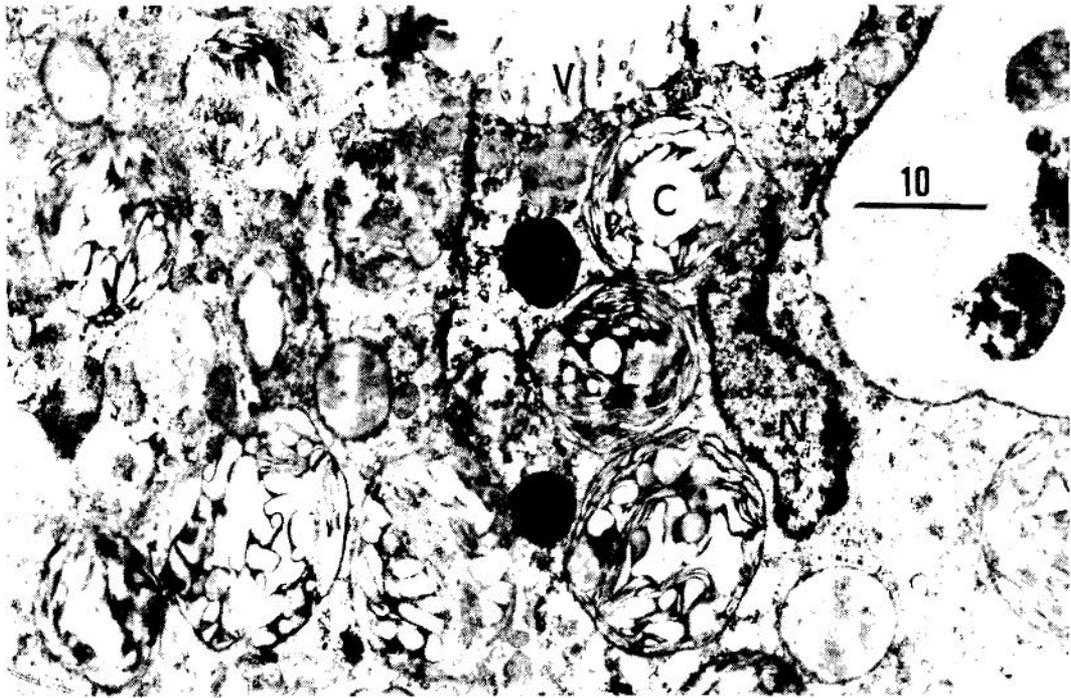
### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La simbiosis, en su sentido más amplio, ha resultado ser un fenómeno mucho más extendido de lo que se creía (MARGULIS, 1970; MARGALEF, 1974; TAYLOR, 1981; WILKINSON, 1982; etc.). El resultado de un consorcio de simbiosis es que cada uno de los dos simbiositas (o el mismo consorcio) es más eficiente y resulta dotado de mayores capacidades competitivas, de un nicho más amplio, de mayor supervivencia, etc. Se ha sugerido, con buenas bases, que el origen de la célula eucariota hay que buscarlo en la simbiosis (MARGULIS, 1981); en el otro extremo, a nivel de ecosistema, el arrecife de coral es un ejemplo notable de la capacidad de estructuración ambiental y de organización del espacio que puede derivarse de las ventajas metabólicas de la simbiosis intracelular.

Entre ambos extremos, la célula y el ecosistema, se halla todo un conjunto de relaciones a nivel celular y de organismos (TAYLOR, 1981), y en cada caso las ventajas para los simbiositas son (o se suponen) evidentes. Para los opisthobranchios Sacoglosos, al descubrimiento relativamente reciente de su capacidad para retener cloroplastos algales funcionales no ha seguido en general un estudio profundo de la importancia ecológica y evolutiva de tal relación (CLARK & BUSACCA, 1978). Muy resumidamente puede indicarse que la presencia de cloroplastos se ha señalado en muchas especies de sacoglosos, la actividad fotosintética de los mismos se ha comprobado en algunas especies, pero el papel de los fotosintetatos en la biología de los moluscos es todavía oscuro (GREENE, 1970; TRENCH *et al.*, 1970; HINDE, 1983; THOMPSON, 1984). Por otra parte HINDE (1983) pone de manifiesto la posible incongruencia de calificar de simbiosis una relación en la que uno de los consortes (los cloroplastos algales) no es genéticamente autónomo, con lo que no puede beneficiarse de su incorporación a células animales. Por ello esta autora sugiere que la denominación «retención de organelos ajenos» es más correcta que «simbiosis algal o con cloroplastos».

FIGURA 5. Microelectrografía de cloroplastos en el epitelio intestinal de *E. rimida*; clave de símbolos en fig. 4. Escala en micras.

Electromicrography of chloroplasts in the intestinal epithelium of *E. timida*; symbol key in fig. 4. Scale bar in microns



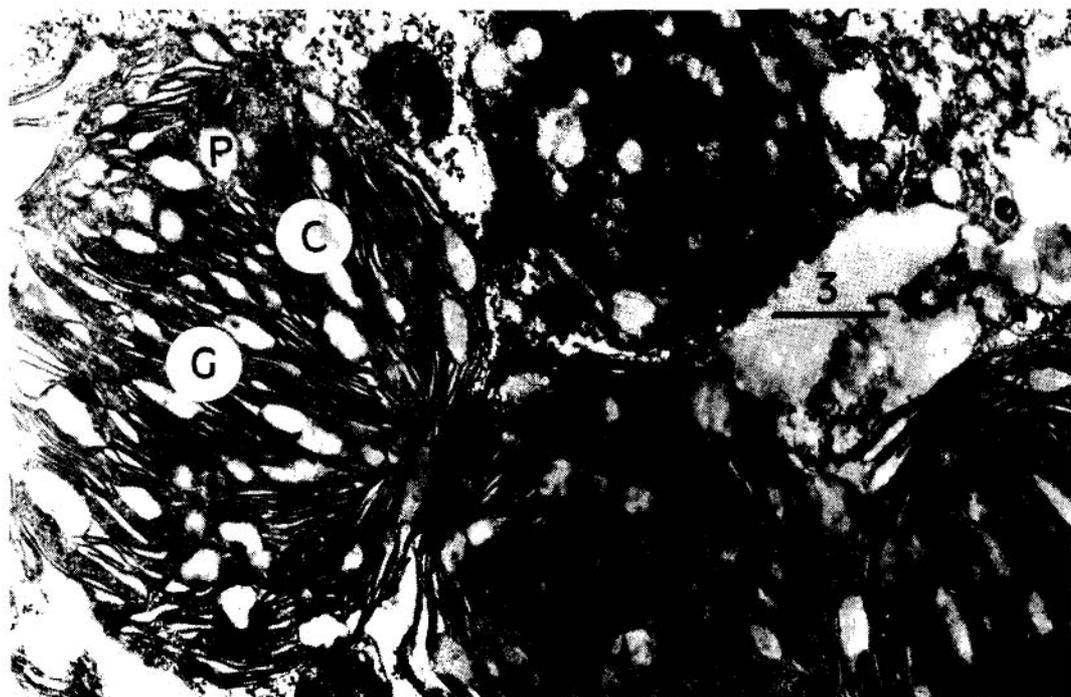
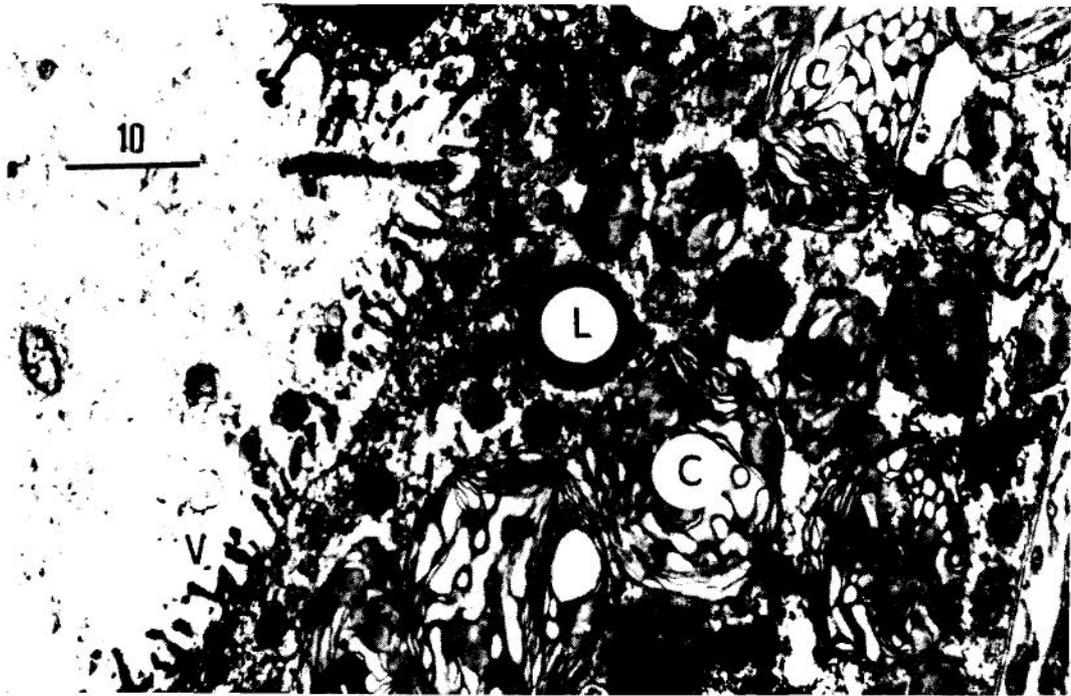


FIGURA 6. Microelectrografía de cloroplastos en el epitelio intestinal de *E. timida*; se aprecian los microvillis. Clave de símbolos en fig. 4. Escala en micras.

Electromicrography of chloroplasts in the intestinal epithelium of *E. timida*; the microvilli are apparent. Symbol key in fig. 4. Scale bar in microns.

En los Elisiáceos, sacoglosos en los que parece que la morfología del cuerpo (ramificación de la glándula digestiva, parapódos del manto) es la más adecuada para albergar orgánulos fotosintéticos (máxima exposición a la luz, intercambio gaseoso óptimo, etc.), todos los indicios apuntan hacia una aparente correlación entre la amplitud del espectro alimentario (realmente notable en estos opistobranquios) y la duración de la actividad fotosintética (así como el número) de los cloroplastes. Se ha supuesto asimismo que la duración de la actividad fotosintética es una propiedad de estos organelos y no de los moluscos (GREENE, 1974). En cualquier caso, no se ha probado que los fotosintetatos traslocados de los cloroplastos a los sacoglosos sean indispensables para los moluscos. La presencia de fotosintetatos en el mucus pedio no oculta el hecho de que todos los Sacoglosos, con simbiontes o sin ellos, producen grandes cantidades de mucus. Por otra parte, la permanencia de clorofila fotosintéticamente activa en animales mantenidos en ayunas no impide aparentemente que éstos mueran (véase, entre otros, JENSEN, 1980, donde se revisan las dietas alimentarias de unas 60 especies de sacoglosos, y HINDE, 1983). Y, sin embargo, determinadas características de la biología de los moluscos con simbiontes algales no se explican sino como una adaptación al mejor funcionamiento de los cloroplastos; en *Elysia timida*, entre otros: limitación a los ambientes superficiales, muy iluminados, de las aguas litorales; fototropismo positivo en el laboratorio; desplazamiento rítmico y brusco (BALLESTEROS, 1980; BOUCHET, 1984), que sin duda facilita la renovación de agua de la cavidad paleal, etc.

Todo ello se indica para centrar en su justa medida los resultados del estudio que se presenta. *Elysia timida* se añade a partir de los mismos a la lista de especies de sacoglosos que poseen cloroplastos simbiontes (o, simplemente, retenidos), que son capaces de fotosintetizar activamente y que, al mismo tiempo, presentan una estrecha relación alimentaria con una espe-

FIGURA 7. Microelectrografía de cloroplastos en el epitelio intestinal de *E. timida*; la estructura de éstos se aprecia claramente. Clave de símbolos en fig. 4. Escala en micras.

Electromicrography of chloroplasts in the intestinal epithelium of *E. timida*; their structure is clearly seen. Symbol key in fig. 4. Scale bar in microns.

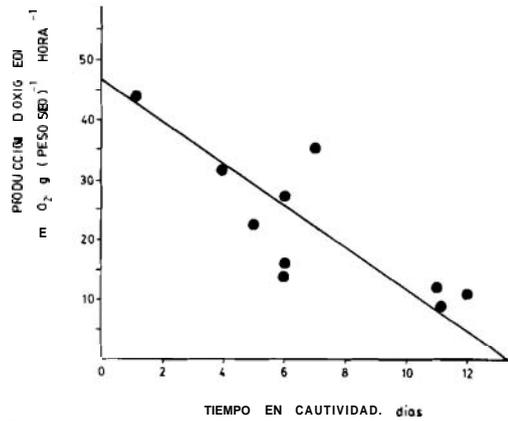


FIGURA 8. Producción de oxígeno por *E. timida* en cautividad.

Oxygen production by *E. timida* in captivity.

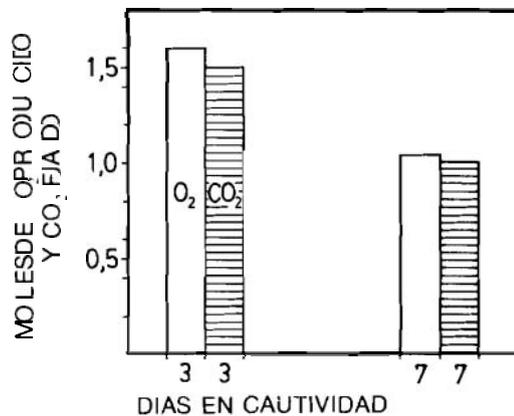


FIGURA 9. Comparación entre la cantidad de oxígeno producido y de dióxido de carbono fijado por *Elysia timida*, en función del tiempo de cautividad.

A comparison between amount of produced oxygen and of fixed carbon dioxide by *Elysia timida*, as a function of time in captivity.

cie determinada de alga. Asimismo, para esta especie se ha evidenciado que los cloroplastos se degradan con el paso del tiempo, que su número disminuye, que la producción de oxígeno y la fijación de carbono descienden. Sin embargo, no se han observado diferencias en la supervivencia de animales mantenidos en ayunas a la luz y a la oscuridad, aunque las experiencias no son conclusivas y por ello no se han comentado sus resultados.

No hay, por el momento, otros resultados; se pretende, en un futuro inmediato, demostrar sin lugar a dudas el origen de los cloroplastos, caracterizar los fotosintetatos, seguir su ruta metabólica en el animal, descubrir su papel en la biología de estos moluscos, averiguar si la presencia de cloroplastos en el adulto se debe a herencia genética o a ingesta, etc. Todo ello supone un estudio ulterior al que aquí se presenta.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de varias personas y centros de la Universidad de Murcia. Los autores hacen constar su agradecimiento: al Dr. Francesc Torrella (Depto. Microbiología), al Servicio de Microscopía Electrónica; al Depto. de Citología e Histología, en especial a la Dra. Blanca Agulleiro; al Depto. de Fisiología Vegetal, y sobre todo al Sr. Marcos Sabater; asimismo, a todos los compañeros del laboratorio de bentos del Depto. de Ecología. El Dr. Francisco Sabater (Depto. de Fisiología Vegetal) y la Dra. Merce Durfort (Depto. de Morfología Microscópica, Fac. de Biología, Univ. de Barcelona) hicieron comentarios y sugerencias muy valiosas al manuscrito.

#### BIBLIOGRAFÍA

- BALLESTEROS, M. 1979. *Bosellia mimetica* Trinchese 1891 y *Elysia timida* Risso 1818, dos sacoglossos nuevos para la fauna ibérica. *Publ. Depto. Zoolo-gía*, 4: 13-17.
- BALLESTEROS, M. 1980. *Contribución al conocimiento de los Sacoglossos y Nudibranchios (Mollusca: Opisthobranchia)*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- BOUCHET, P. 1984. Les Elysiidae de Méditerranée (Gastropoda, Opisthobranchiata). *Ann. Inst. Océanogr.*, Paris, 60(1): 19-28.
- BRANDT, K. 1883. *Zool. Sta. Neapel*, 4: 191.
- CLARK, K. B. & BUSACCA, M. 1978. Feeding specificity and chloroplasts retention in four tropical sacoglossa, with a discussion of the extent of chloroplasts and the evolution of the order. *J. Moll. Stud.*, 44: 272-282.
- FREIFELDER, D. 1979. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté. Barcelona.
- GRAVES, D. A., GIBSON, M. A. & BLEAKNEY, J. S. 1979. The digestive diverticula of *Alderia modesta* and *Elysia chlorotica* (Opisthobranchia: Sacoglossa). *Veliger*, 21(4): 415-423.
- GREENE, R. W. 1970a. Symbiosis in sacoglossan opisthobranchs: symbiosis with algal chloroplasts. *Malacologia*, 10(2): 357-368.
- GREENE, R. W. 1970b. Symbiosis in sacoglossan opisthobranchs: translocation of photosynthetic products from chloroplasts to host tissue. *Malacologia*, 10(2): 369-380.
- GREENE, R. W. 1974. Sacoglossans and their chloroplast endosymbionts. In: *Symbiosis in the sea* (W. B. Vernberg, ed.): 21-27. University S. Carolina Press. Columbia. South Carolina.
- GREENE, R. W. & MUSCATINE, L. 1972. Symbiosis in Sacoglossan Opisthobranchs: photosynthetic products of animal-chloroplast associations. *Marine Biology*, 14: 253-259.
- HINDE, R. 1983. Retention of algal chloroplasts by molluscs. In: *Algal symbiosis. A continuum of interaction strategies* (L. J. Goff, ed.): 97-107. Cambridge University Press. Cambridge.
- HINDE, R. & SMITH, D. C. 1975. The role of photosynthesis in the nutrition of the mollusc *Elysia viridis*. *Biol. J. Linn. Soc.*, 7:161-171.
- JENSEN, K. 1980. A review of Sacoglossan diets, with comparative notes on radular and buccal anatomy. *Malacological Review*, 13: 55-57.
- KAWAGUTI, S. & YAMASU, T. 1965. Electron microscopy on the symbiosis between an elysioid gastropod and chloroplasts of a green alga. *Biol. J. Okayama Univ.*, 11(3-4): 57-65.
- MARGALEF, R. 1967. La vida suspendida en las aguas. In: *Ecología marina* (R. Margalef, ed.): 493-532. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Caracas.
- MARGALEC., R. 1974. *Ecología*. Omega. Barcelona.
- MARGULIS, L. 1970. *Origin of eukaryotic cells*. Yale University Press. New Haven.
- MARGULIS, L. 1981. *Symbiosis in cell evolution*. Freeman. San Francisco.
- NAVILLE, A. 1926. Notes sur les eolidiens. Un eolidien d'eau saumâtre. Origine des nématocystes. Zooxanthes et homochromie. *Rev. Suisse Zool.*, 33: 251-289.
- NEGRI, A. de & NEGRI, G. de. 1876. *Ber. Deut. Chem. Gesellsch.*, 9: 84.
- PARSONS, T. R., MAITA, Y. & LALLI, C. M. 1984. *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press. Oxford, etc.
- PÉREZ, I. 1983. *Estudio de la flora sumergida de los afloramientos volcánicos del litoral murciano*. Tesis de licenciatura. Universidad de Murcia.
- RAHAT, M. & MONSELISE, E. 1979. Photobiology of the chloroplasts hosting mollusc *Elysia timida* (Opisthobranchia). *J. Exp. Biol.*, 79: 225-233.
- ROS, J. D. 1978. La alimentación y el sustrato en los opisthobranchios ibéricos. *Oecologia aquarica*, 3: 153-166.
- ROS, J. D. (ed.). 1979. *Prácticas de Ecología*. Omega. Barcelona.
- ROS, J. D. 1981. Noves citacions de gasterópodes opisthobranchios de les Gimnèsies. *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.*, 47 (Sec. Zool., 4): 175-177.
- ROS, J. D. (Ed.). En prensa. *El Mar Menor. Características fisiográficas, florísticas y faunísticas de la*

- laguna y de su zona ribereña inmediata*. Editora Regional. Murcia.
- STEEAMAN-NIELSEN., R. 1952. The use of radioactive carbon (C-14) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 18: 117-140.
- SWENNEN, C. 1961. On a collection of opisthobranchia from Turkey. *Zool. Med.*, 37(3): 41-75.
- TAYLOR, D. L. 1967. The occurrence and significance of endosymbiotic chloroplasts in the digestive glands of herbivorous opisthobranchs. *J. Phycol.*, 3: 234-235.
- TAYLOR, D. L. 1981. Evolutionary impact of intracellular symbiosis. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 94: 583-590.
- THOMPSON, T. E. 1976. *Biology of Opisthobranch Molluscs*. M. Ray Society. London.
- THOMPSON, T. E. 1984. *Biology of Opisthobranch Molluscs*. II. Ray Society. London.
- TRENCH, R. K. & SMITH, D. C. 1970. Synthesis of pigment in symbiotic chloroplasts. *Nature*, 227: 196-197.
- TRENCH, M. F., TRENCH, R. K. & MUSCATINE, L. 1970. Utilization of photosynthetic products of symbiotic chloroplasts in mucus synthesis by *Placobranchus ianthobapsus* (Gould), Opisthobranchia, Sacoglossa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 37: 113-117.
- WILKINSON, C. R. 1982. Net primary productivity in coral reef sponges. *Science*, 219: 410-412.
- YONGE, C. M. & NICHOLAS, H. M. 1940. Structure and function of the gut and symbiosis with zooxanthellae in *Tridachia crispata* (Oerst.). *Bgh. Pap. Tortugas Lab.*, 32: 287-301.