

## Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles

## Inducción de la metamorfosis con KCl en tres especies de erizos de mar y sus implicaciones en la producción de juveniles

E. Carpizo-Ituarte\*  
A. Salas-Garza  
G. Parés-Sierra

Instituto de Investigaciones Oceanológicas  
Universidad Autónoma de Baja California  
Apartado Postal 453  
Ensenada, B. C. México 22800  
\*E-mail: [ecarpizo@uabc.mx](mailto:ecarpizo@uabc.mx)

*Recibido en octubre de 2001; aceptado en febrero de 2002*

### Abstract

A common practice for inducing metamorphosis in larvae of marine invertebrates is the use of a wide variety of artificial inducers. Excess  $K^+$  and  $Cs^+$  in seawater have proved to be very effective for this purpose, but not universally effective to induce metamorphosis in different phyla of marine invertebrates. In the present study we tested the response of three species of sea urchins to excess  $K^+$  in seawater as an artificial inducer. Excess  $K^+$  in seawater was presented to the larvae as continuous (24 h) or pulse exposure in concentrations ranging from 0.01 to 100 mM. Results showed that excess  $K^+$  in the form of KCl added to seawater was an effective metamorphic inducer of the three species of sea urchins tested; the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*, the red sea urchin *S. franciscanus* and the white sea urchin *Lytechinus pictus*. The response was dependent on concentration and time of exposure. Continuous exposure (24 h or more) to excess  $K^+$  (100 mM) resulted lethal to the larvae of the three species. Excess  $K^+$  (100 mM) for 15 min resulted the most effective pulse-period to induce metamorphosis in the three species. This method of induction allows us to produce synchronous metamorphosed postlarvae useful for aquaculture and studies of signal transduction mechanisms during metamorphosis of sea urchins.

*Key words:* metamorphosis, sea urchin, excess potassium, signal transduction.

### Resumen

La utilización de inductores artificiales es una práctica común para inducir la metamorfosis en larvas de invertebrados marinos. Potasio ( $K^+$ ) en exceso y  $Cs^+$  en el agua de mar, han demostrado ser muy efectivos para estos propósitos, pero no universalmente efectivos para inducir la metamorfosis en diversos fila de invertebrados marinos. En el presente estudio, se puso a prueba la respuesta de tres especies de erizo de mar en presencia de exceso de  $K^+$  en el agua de mar, como inductor artificial. Las larvas fueron expuestas a un exceso de  $K^+$  en el agua de mar en forma continua (24 h) o en pulsos de concentraciones de 0.01 a 100 mM. Los resultados mostraron que el exceso de  $K^+$  agregado al agua de mar en forma de KCl fue un inductor efectivo para las tres especies de erizo, el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, el rojo *S. franciscanus* y el blanco *Lytechinus pictus*. La respuesta fue en función de la concentración y el tiempo de exposición. Las larvas de las tres especies murieron cuando fueron expuestas en forma continua (24 h o más) al exceso de  $K^+$  (100 mM). La exposición a un exceso de  $K^+$  (100 mM) por 15 minutos resultó la forma más efectiva para inducir la metamorfosis en las tres especies. Este método de inducción permite la obtención de postlarvas que se metamorfozan en forma sincrónica, y resulta útil para fines acuaculturales o para estudios relacionados con rutas de transducción y expresión genética durante la metamorfosis de erizos de mar.

*Palabras clave:* metamorfosis, erizo de mar, exceso de potasio, rutas de transducción.

### Introduction

In many marine invertebrates the use of artificial compounds is a common practice to induce metamorphosis and has been used as a way to get a better understanding of the possible transduction pathways involved during metamorphosis

### Introducción

En muchos invertebrados marinos, el uso de compuestos artificiales es una práctica común para inducir a la metamorfosis y ha sido utilizada para entender mejor las posibles rutas de transducción involucradas en la metamorfosis (Pawlik, 1990;

(Pawlik, 1990; Hadfield, 1998). A side application of the use of artificial inducers to metamorphosis is its use as a way to obtain larvae that undergo metamorphosis synchronously and produce juveniles for aquaculture or conservation purposes.

The use of  $K^+$  as inducer in many invertebrates, follows the initial report by Müller and Buchal (1973) for larvae of *Hydractinia echinata* and, more recently, the work by Baloun and Morse (1984) on abalone, and Yool *et al.* (1986) on the effects of this cation on induction of metamorphosis of four species of larvae of marine invertebrates. Nearly all researchers who have used potassium as an inducer of metamorphosis in invertebrate larvae hypothesize a role for depolarization in induction (e.g., Yool *et al.*, 1986). However, the possibility exists, that potassium is also acting downstream of primary externally accessible excitable cells (Todd *et al.*, 1991; Hadfield *et al.*, 2000). Excess  $K^+$  and  $Cs^+$  in seawater have been some of the ions most widely used and probed to be effective in marine invertebrates to induce metamorphosis (Woollacott and Hadfield, 1996; Carpizo-Ituarte and Hadfield, 1998; for summary of references). Although we still do not know the mechanism by which these compounds trigger metamorphosis, artificial inducers have been reliable to manipulate metamorphosis in captivity of many marine invertebrates.

In sea urchins several compounds have been used to induce metamorphosis with different rates of success. The most common ones are  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), L-glutamine and certain inorganic cations, particularly  $K^+$  (Cameron *et al.*, 1989; Yasaki and Harashima, 1994; Yasaki, 1995; Naidenko, 1996; Preciado-Pinedo, 2000).

Potassium chloride has been useful to induce metamorphosis at least in two species of seastars (Pearce and Schiebling, 1994) and several species of sea urchins including *Lytechinus variegatus* (Cameron *et al.*, 1989), *L. pictus* and *Arbacia punctulata* (Cameron and Hinegardner, 1974). Previous results in the laboratory by Preciado-Preciado (2000) indicated also sensitivity of *Strongylocentrotus franciscanus* to excess  $K^+$  in seawater to trigger metamorphosis in this species.

In the present study we tested the effectiveness of excess potassium in sea water as inducer of metamorphosis in two commercial species of sea urchins in Baja California: the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* and the purple sea urchin *S. purpuratus*, as well as the white sea urchin *Lytechinus pictus*, whose eggs are commonly used to study signal transduction mechanisms during fertilization.

## Materials and methods

### Culture of larvae

Adult red (*Strongylocentrotus franciscanus*), purple (*S. purpuratus*) and white (*Lytechinus pictus*) sea urchins were collected from Punta Banda, Baja California, transported to the laboratory and kept in tanks with running seawater until needed. Eggs and sperm were obtained using an injection of 0.5 to 3 ml of 0.53M KCl into the coelom of the mature adults according to the method described by Strathmann (1987). The

Hadfield, 1998). Una aplicación colateral del uso de inductores artificiales es que éstos se utilizan para lograr que las larvas entren en el proceso de metamorfosis de manera sincronizada y se produzcan juveniles con propósitos acuaculturales o de conservación.

El uso de  $K^+$  como inductor en muchos invertebrados, sigue el reporte inicial de Müller y Buchal (1973) para larvas de *Hydractinia echinata* y, más recientemente, el trabajo de Baloun y Morse (1984) en abulones, y el de Yool *et al.* (1986) sobre los efectos de este catión en la inducción a la metamorfosis de cuatro especies de larvas de invertebrados marinos. Casi todos los investigadores que han utilizado potasio como inductor a la metamorfosis en larvas de invertebrados, le confieren una capacidad para facilitar la despolarización durante la inducción (e.g., Yool *et al.*, 1986). Sin embargo, existe la posibilidad de que el potasio también actúe en otras células, además de las externas que se excitan primero (Todd *et al.*, 1991; Hadfield *et al.*, 2000). Unos de los iones más ampliamente utilizados y que probaron ser efectivos en invertebrados marinos para inducir a la metamorfosis han sido el  $K^+$  y el  $Cs^+$  (Woollacott y Hadfield, 1996; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; para un resumen de referencias). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual estos compuestos desencadenan la metamorfosis, los inductores artificiales han sido utilizados de manera confiable para manipular este proceso en muchos invertebrados marinos en cautiverio.

En los erizos de mar se han utilizado muchos compuestos para inducir a la metamorfosis con distintas tasas de éxito. Los más comunes son el ácido  $\alpha$ -aminobutírico (GABA), la L-glutamina y algunos cationes inorgánicos, particularmente el  $K^+$  (Cameron *et al.*, 1989; Yasaki y Harashima, 1994; Yasaki, 1995; Naidenko, 1996; Preciado-Pinedo, 2000).

El cloruro de potasio ha servido para inducir la metamorfosis de al menos dos especies de estrellas de mar (Pearce y Schiebling, 1994), así como de varias especies de erizos de mar incluyendo *Lytechinus variegatus* (Cameron *et al.*, 1989), *L. pictus* y *Arbacia punctulata* (Cameron y Hinegardner, 1974). Análisis previos de laboratorio realizados por Preciado-Pinedo (2000), también dieron indicios de sensibilidad por parte de *Strongylocentrotus franciscanus* al exceso de  $K^+$  en el agua de mar, tendiendo a desencadenar su metamorfosis.

En el presente estudio probamos la efectividad del exceso de potasio en el agua de mar como un inductor a la metamorfosis en dos especies comerciales de erizo de mar de Baja California: el erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y el erizo morado *S. purpuratus*, así como del erizo blanco *Lytechinus pictus*, cuyos huevos son comúnmente utilizados para estudiar las rutas de transducción durante la fertilización.

## Materiales y métodos

### Cultivo de larvas

Se colectaron adultos de erizos rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*), morado (*S. purpuratus*) y blanco (*Lytechinus pictus*) en la zona de Punta Banda, Baja California, los cuales

amount of KCl used was according to the size of the species of sea urchin (*L. pictus* needed less than 0.5 mL of KCl solution). The urchins were allowed to shed the gametes by putting them with their oral side facing up, on top of 250-mL glass bottles, or 10-mL plastic vials for the smaller *L. pictus*, filled with filtered seawater (1- $\mu$ m cuno filters, Cole Parmer). Fertilized eggs were rinsed with filtered and UV-sterilized seawater and raised in 20-L commercial plastic buckets until they reached the prism stage (about 48 h after fertilization). After the larvae reached the prism stage, they were transferred to 100-L fiberglass containers and fed with *Rhodomonas* sp. Larvae were cultured with continuous aeration at 2 larvae/mL until they reached competence. Larvae were considered competent when the rudiment occupied most of the central cavity of the larva, the tube feet were clearly visible and, in the cases of *S. franciscanus* and *L. pictus*, the pedicelaria were noticeable (fig. 1a, c). At 16°C, larvae of *S. franciscanus* reached competency after 26 days after fertilization, *S. purpuratus* after 21 days and *L. pictus* after 22 days.

#### Assay methods

Competent larvae were used in all experiments. All assays were conducted in 10-mL plastic Multiwell plates (Falcon, 6 wells) using sterilized seawater (SW). Groups of 23 to 50 competent larvae were pipetted into each dish containing SW, then KCl was added until the desired concentration was reached. The number of larvae that had metamorphosed was determined 24 h later by observing the larvae through a dissecting microscope. Larvae were considered to have undergone metamorphosis when they showed the characteristic round shape of the juvenile urchin with their spines and tube feet clearly visible (fig. 1b, d).

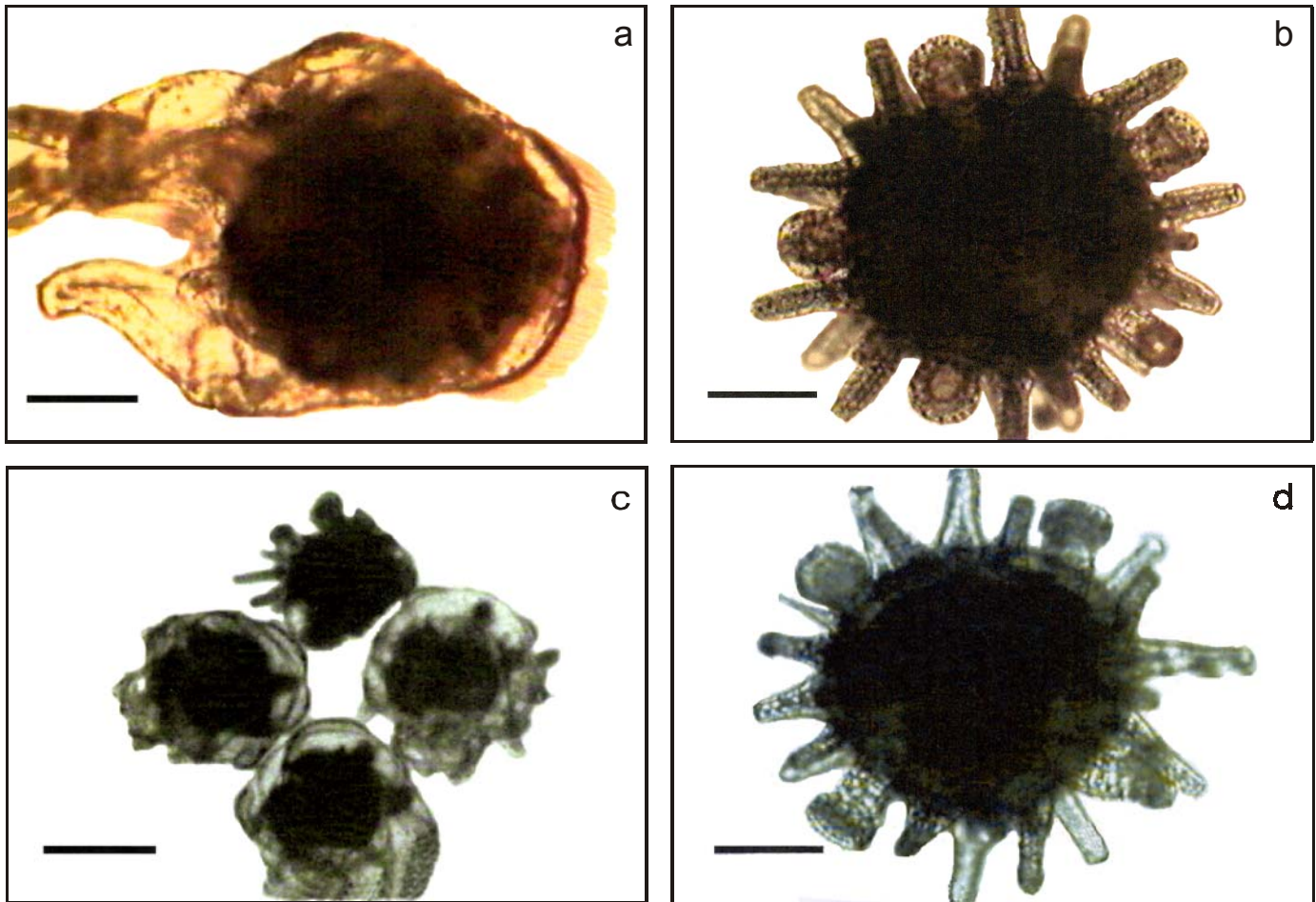
In all the assays, positive and negative controls were included. Positive controls for the experiments with *S. purpuratus* and *S. franciscanus* consisted of a monoculture film of the diatom *Navicula inserta* attached to the bottom of the well for at least 2 days before the experiment was performed. Previous results in the laboratory showed that *S. franciscanus* metamorphosed in the presence of films of benthic diatoms (Preciado-Pinedo 2000). Positive controls in the experiment with *L. pictus*, consisted of sand containing a biofilm obtained from the tank where the adult sea urchin were kept (SndA); and wells previously coated with biofilm also from the adults but without the sand (BioA). Positive controls were included to stimulate metamorphosis of the larvae using conditions previously shown effective to induce metamorphosis in sea urchin species. In the case of *L. pictus*, previous results in the laboratory showed that sand containing a biofilm obtained from the tank where the adult sea urchins were kept trigger competent larvae of the white sea urchin to metamorphose. In all the experiments, negative controls, included to measure spontaneous metamorphosis, consisted of placing larvae in SW in a clean well during the experimental period.

fueron transportados al laboratorio y mantenidos en tanques con flujo de agua de mar hasta ser utilizados. Los huevos y el esperma se obtuvieron aplicando una inyección de 0.5 a 3 mL de KCl 0.53M en el celoma de los organismos adultos, de acuerdo al método descrito por Strathmann (1987). La cantidad de KCl utilizada fue de acuerdo al tamaño de la especie de erizo (*L. pictus* requirió menos de 0.5 mL de solución de KCl). Se permitió que los erizos expulsaran los gametos colocándolos con el extremo oral hacia arriba sobre frascos de vidrio de 250 mL, o viales de plástico de 10 mL para *L. pictus* que es más pequeño, conteniendo agua de mar filtrada (filtros cuno de 1  $\mu$ m, Cole Parmer). Los huevos fertilizados fueron enjuagados con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV y posteriormente mantenidos en cubetas comerciales de 20 L hasta que alcanzaron el estadio prisma (cerca de 48 h después de la fertilización). Una vez que las larvas alcanzaron el estadio prisma, estas fueron transferidas a contenedores de fibra de vidrio de 100 L y alimentadas con la microlaga *Rhodomonas* sp. Las larvas se cultivaron con aireación continua a una concentración de 2 larvas/mL hasta que fueron competentes. Las larvas fueron consideradas competentes cuando el rudimento ocupó casi la totalidad de la cavidad central de la larva, los pies ambulacrales fueron claramente visibles y, en el caso de *S. franciscanus* y *L. pictus*, se notaron los pedicelarios (fig. 1a, c). A 16°C, las larvas de *S. franciscanus* se tornaron competentes 26 días después de la fertilización, *S. purpuratus* después de 21 días y *L. pictus* después de 22 días.

#### Métodos experimentales

En todos los experimentos se utilizaron larvas competentes. Todos los ensayos fueron llevados a cabo en cajas de Petri de depósitos múltiples de plástico de 10 mL (Falcon, de 6 depósitos) utilizando agua de mar esterilizada (SW). Las larvas competentes se depositaron en grupos de 23 a 50 larvas mediante pipetas a cada una de las placas con SW; después se añadió KCl hasta alcanzar la concentración deseada. Veinticuatro horas después se determinó el número de larvas metamorfizadas mediante su observación con un microscopio de disección, considerando que éstas se habían metamorfizado cuando mostraban la forma redonda característica del erizo de mar juvenil, con sus espinas y pies ambulacrales claramente visibles (fig. 1b, d).

En todos los experimentos se incluyeron controles positivos y negativos. Los controles positivos para los experimentos con *S. purpuratus* y *S. franciscanus* consistieron en una película de un cultivo axénico de *Navicula inserta* adherida al fondo del depósito por al menos dos días antes de que el experimento se llevara a cabo. Resultados previos de laboratorio obtenidos por Preciado-Pinedo (2000) mostraron que *S. franciscanus* inició la metamorfosis en presencia de películas de diátomeas bénticas. El control positivo en el experimento con *L. pictus* consistió en arena que contenía una biopelícula obtenida del tanque en que los organismos adultos fueron mantenidos (SndA) y de cajas de Petri con depósitos múltiples previamente cubiertos con una biopelícula también proveniente de



**Figure 1.** Competent larvae (a, c) and recently metamorphosed postlarvae (b, d) of the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* (a, b) and *Strongylocentrotus franciscanus* (c, d). Scale bars: 100 $\mu$ m (a) and 200 $\mu$ m (b, c and d).

**Figura 1.** Larva competente (a, c) y postlarva recientemente metamorfozada (b, d) de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (a, b) y *Strongylocentrotus franciscanus* (c, d). Barras de escala: 100 $\mu$ m (a) y 200 $\mu$ m (b, c y d).

Two different experiments were conducted to test the effects of  $K^+$  as an artificial inducer. Excess  $K^+$  was added as dissolved KCl in solution:

*Continuous exposure.* Larvae were exposed to the test solution throughout the experimental period. Response to excess  $K^+$  was tested in SW with KCl concentrations increased by 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mM.

*Pulse exposure.* Larvae were exposed to the test solution for a determined period of time and then the solution of KCl was removed and replaced with fresh SW in which the larvae remained until the end of the experiment. Pulse durations of 15 (except *S. franciscanus*) and 30 min, 1, 3, 6 and 12 h were used for all the species.

#### Statistical analyses

Statistical differences among treatments were tested with one-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) or Kruskal-Wallis ranking test when equal-variance tests failed. Pair-wise multiple comparisons were tested using the Bonferroni *t*-test or the

los adultos, pero sin arena (BioA). Los controles positivos se incluyeron para estimular la metamorfosis de las larvas utilizando condiciones previamente demostradas como efectivas para inducir la metamorfosis en erizos de mar. En el caso de *L. pictus*, análisis previos de laboratorio habían mostrado que la arena que contenía una biopelícula obtenida de los tanques en que se mantenían los adultos desencadenaba la metamorfosis de las larvas competentes del erizo blanco. En todos los experimentos, los controles negativos incluidos para medir la metamorfosis espontánea, consistieron en colocar las larvas en SW en una caja de Petri limpia durante el periodo experimental.

Dos experimentos distintos se llevaron a cabo para probar el efecto del  $K^+$  como inductor artificial. El exceso del  $K^+$  fue añadido en forma de KCl disuelto:

*Exposición continua.* Las larvas fueron expuestas a la solución de prueba durante todo el período experimental. La respuesta al exceso de  $K^+$  fue probada en SW con KCl en concentraciones incrementadas en 0.01, 0.1, 1, 10 y 100mM.

*Exposición en pulsos.* Las larvas fueron expuestas a la solución de prueba por un periodo determinado de tiempo y posteriormente la solución de KCl fue removida y reemplazada

Tukey method. All tests were conducted with the aid of SigmaStat software.

## Results

### Continuous and pulse exposure to excess K<sup>+</sup>

Excess K<sup>+</sup> in seawater caused competent larvae of *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* and *Lytechinus pictus* to metamorphose (fig. 1). This response was dependent on duration of exposure and concentration. Of the KCl concentrations tested, 100 mM was the most effective to induce metamorphosis, but mortality increased as soon as 3 h after the larvae were exposed to the treatment (see fig. 3, for *L. pictus*). In all species, lengths of exposure of 24 h to 100 mM excess KCl in seawater, induced metamorphosis but were toxic for the larvae and almost 100% of them died (data not shown). Sensitivity to excess K<sup>+</sup> was higher in *L. pictus* than in *S. franciscanus* and *S. purpuratus* (see % mortality in figs. 2, 3 and 4). Lower concentrations of potassium were always less effective to induce metamorphosis on any of the species of sea urchins tested despite the exposure time length. For *S. purpuratus*, percentages of metamorphosis varied between 3.3% with 0.01 mM excess potassium, and 25% with 10 mM excess K<sup>+</sup>, when larvae were kept in the solution for 24 h. Percentages of metamorphosis for the same species (*S. purpuratus*), ranged between 16.6% to 29.6% when larvae were exposed for periods of 15 and 30 min, and 1, 3, 6, and 12 h to 10 mM excess K<sup>+</sup>. Pulse exposure to 10 mM excess K<sup>+</sup> was more effective to induce metamorphosis in *S. franciscanus*, than in *S. purpuratus*. Periods of exposure of competent larvae of *S. franciscanus* ranging from 0.5 to 12 h were long enough to induce as high as 56% metamorphosis. However, percentages of metamorphosis were never as high as those obtained with short pulses of 100 mM excess K<sup>+</sup>. Fifteen-min to 1-h pulse exposures to 100 mM excess K<sup>+</sup> were the most effective on inducing metamorphosis with low levels of mortality for the three species.

Exposure of competent larvae of *S. franciscanus* to a concentration of 100 mM KCl for as few as 30 min was enough to induce metamorphosis in 98% of the larvae (fig. 2). Percentages of metamorphosis with this pulse-period tested were significantly different from those obtained with SW (Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ). These high levels of metamorphosis were also observed in treatments where the larvae were exposed for 1 and 3 h to KCl. The percentage of metamorphosis decreased to about 74% in the treatments where the larvae were exposed to 100 mM KCl for 6 and 12 h (fig. 2). Mortality was also proportional to the period of exposure to excess K<sup>+</sup> in seawater (fig. 2). In the treatments where the larvae were exposed for more than 12 h to excess 100 mM K<sup>+</sup> a dramatic increase of mortality was observed, particularly 48 h after exposure to excess K<sup>+</sup> started. Larvae kept in SW remained swimming until the end of the experiment, and those exposed

con SW fresca en la que las larvas permanecieron hasta el final del experimento. La duración de los pulsos fue de 15 (excepto para *S. franciscanus*) y 30 min, 1, 3, 6 y 12 h fueron utilizados para todas las especies.

### Análisis estadísticos

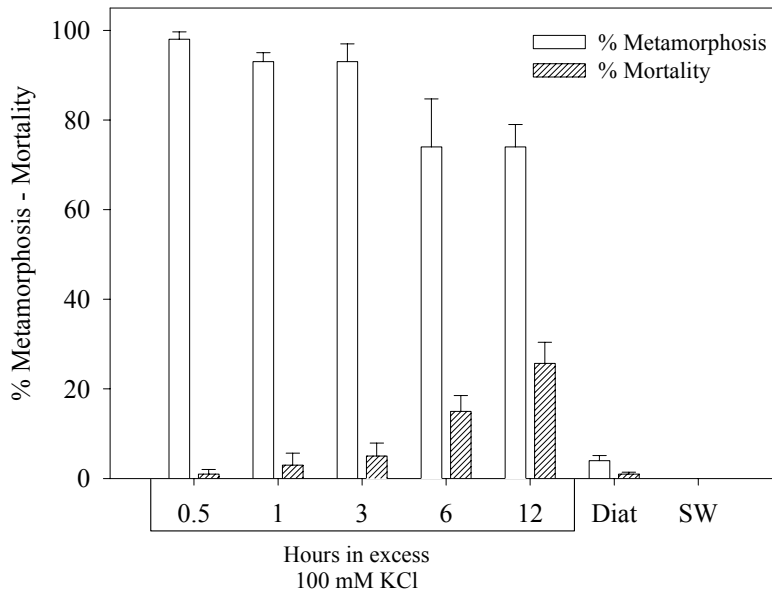
Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron probadas mediante una ANOVA de una vía ( $\alpha = 0.05$ ) o la prueba de rangos de Kruskal-Wallis. No hubo homogeneidad de varianzas. Las comparaciones entre pares múltiples fueron probadas utilizando la prueba *t* de Bonferroni o el método de Tukey. Todas las pruebas se llevaron a cabo con la ayuda del programa SigmaStat.

## Resultados

### Exposición continua y en pulsos al exceso de K<sup>+</sup>

El exceso de K<sup>+</sup> en el agua de mar causó que las larvas competentes de *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* y *Lytechinus pictus* se metamorfozaron (fig. 1). Esta respuesta dependió de la duración de la exposición y la concentración. De las concentraciones de KCl utilizadas, la de 100 mM fue la más efectiva para inducir la metamorfosis, pero la mortalidad se incrementó tan solo 3 h después de que las larvas fueron sometidas al tratamiento (ver fig. 3, para *L. pictus*). En todas las especies, la exposición a 100 mM de KCl en exceso en el agua de mar por hasta 24 h, indujo a la metamorfosis, pero fue tóxica para las larvas, muriendo cerca del 100% de las mismas (datos no mostrados). La sensibilidad al exceso de KCl fue mayor en *L. pictus* que en *S. franciscanus* y *S. purpuratus* (ver el % de mortalidad en las figs. 2, 3 y 4). Las concentraciones más bajas de potasio siempre fueron menos efectivas para inducir a la metamorfosis en cualquiera de las especies de erizos de mar a pesar de la duración de la exposición. Para *S. purpuratus*, los porcentajes de metamorfosis variaron entre 3.3%, a 0.01 mM de exceso de potasio, y 25 %, a un exceso de 10 mM, cuando las larvas se mantuvieron en la solución por 24 h. Los porcentajes de metamorfosis para la misma especie (*S. purpuratus*), tuvieron un rango de 16.6% a 29.6%, cuando las larvas fueron expuestas por periodos de 15 y 30 min, y 1, 3, 6 y 12 h a un exceso de K<sup>+</sup> de 10 mM. La exposición por pulsos a un exceso de K<sup>+</sup> de 10 mM fue más efectiva para inducir a la metamorfosis en *S. franciscanus* que en *S. purpuratus*. Periodos de exposición de larvas competentes de *S. franciscanus* de 0.5 a 12 h fueron suficientes para inducir la metamorfosis hasta en un 56%. Sin embargo, los porcentajes de metamorfosis nunca fueron tan altos como los obtenidos con pulsos cortos de exceso de K<sup>+</sup> de 100 mM. Las exposiciones en pulsos de 15 min a 1 h, con un exceso de K<sup>+</sup> de 100 mM, fueron las más efectivas para inducir la metamorfosis, con menores niveles de mortalidad, para las tres especies.

La exposición de larvas competentes de *S. franciscanus* a excesos de 100 mM de KCl por tan solo 30 min fue suficiente para inducir la metamorfosis en el 98% de las larvas (fig. 2).



**Figure 2.** Metamorphosis of *S. franciscanus* exposed to excess  $K^+$  (100 mM) for 0.5 to 12 h in sterilized seawater (SW). Bars indicate mean percentages of metamorphosis and mortality  $\pm 1$  standard error (SE) ( $n = 3$  replicas/treatment), evaluated 24 h after initial exposure to excess KCl. Diat = Diatom film of *Navicula inserta* inoculated 48 h before adding the larvae.

**Figura 2.** Metamorfosis de *S. franciscanus* expuesto a exceso de  $K^+$  (100 mM) por 0.5 a 12 h en agua de mar esterilizada (SW). Las barras indican los porcentajes medios de metamorfosis y mortalidad  $\pm 1$  desviación estándar (DE) ( $n = 3$  replicas/tratamiento), evaluadas 24 horas después de estar expuestas al exceso de KCl. Diat = Película de la diatomea *Navicula inserta* inoculada 48 horas antes de añadir las larvas.

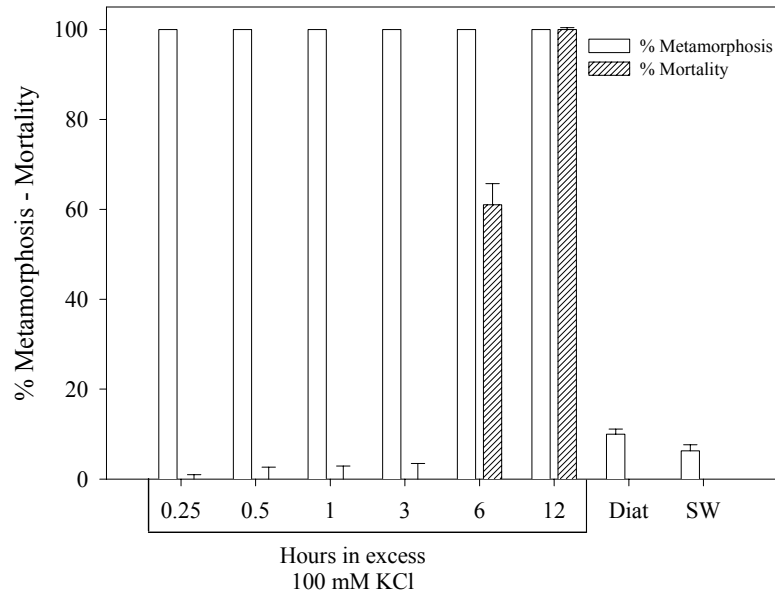
to a biofilm of the benthic diatom *Navicula inserta* experienced metamorphosis only in low percentages (3.0%).

Exposure of competent larvae of *S. purpuratus* to 100 mM excess  $K^+$  in seawater for as few as 15 min was enough to induce 100% metamorphosis. Percentages of metamorphosis with the pulse-period tested were significantly different from those obtained with SW (Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ). In contrast to *S. franciscanus*, when *S. purpuratus* competent larvae were exposed to different lengths of exposure to 100 mM excess  $K^+$ , 100% metamorphosed in all the treatments tested. However, in the 6-h exposure treatment, mortality was near 60% after 24 h. Twelve hours of exposure to the same concentration of excess  $K^+$  killed all the metamorphosed postlarvae evaluated 24 h after initial exposure to excess  $K^+$  and 12 h after changing the solution to fresh SW (fig. 3). The treatments in which the larvae were kept in SW and those exposed to biofilm of *N. inserta* showed low metamorphosis percentages. With the biofilm of the benthic diatom, the highest percentages of metamorphosis were only 12%.

The response of *Lytechinus pictus* to excess  $K^+$  in seawater was similar to that of *S. franciscanus* and *S. purpuratus*. Percentages of metamorphosis as high as 83% were observed for a 30-min pulse exposure to 100 mM excess  $K^+$  (fig. 4). Percentages of metamorphosis with any pulse-period tested were significantly different from those obtained with sterilized water (Tukey,  $P \leq 0.02$ ) and a bacterial film from an exterior

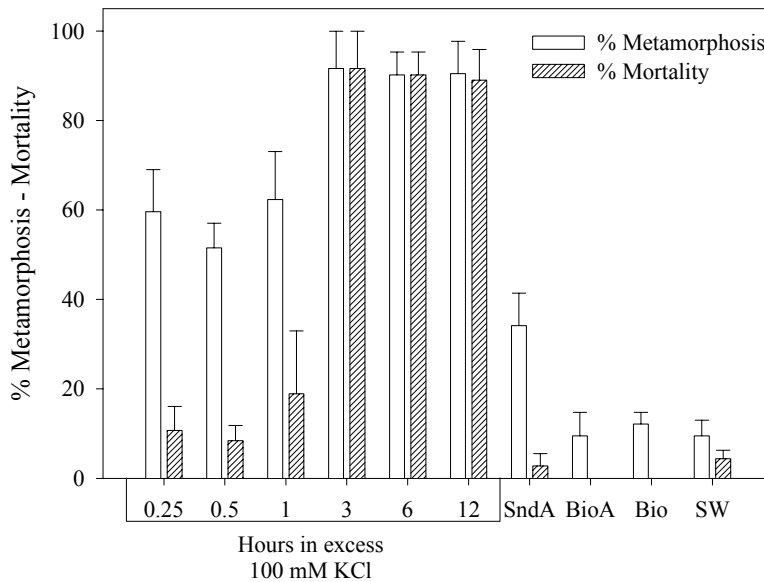
Los porcentajes de metamorfosis con este pulso y periodo fueron significativamente diferentes a aquellos obtenidos con SW (Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ). Estos elevados niveles de metamorfosis fueron observados en tratamientos donde las larvas fueron expuestas por 1 y 3 h al KCl. El porcentaje de metamorfosis disminuyó en casi un 74% en los tratamientos donde las larvas fueron expuestas a 100 mM de KCl por 6 y 12 h (fig. 2). La mortalidad también fue proporcional al periodo de exposición al exceso de  $K^+$  en el agua de mar (fig. 2). En los tratamientos en los que las larvas estuvieron expuestas por más de 12 h a un excedente de  $K^+$  de 100 mM se observó un dramático incremento en la mortalidad, particularmente a 48 h después del inicio de la exposición. Las larvas mantenidas en SW permanecieron nadando hasta el final del experimento y las expuestas a una biopelícula de la diatomea bentónica *Navicula inserta*, sólo mostraron bajos niveles de metamorfosis (3.0%).

La exposición de las larvas competentes de *S. purpuratus* a un exceso de  $K^+$  en agua de mar de 100 mM por tan solo 15 min fue suficiente para inducir la metamorfosis en un 100%. Los porcentajes de metamorfosis con el periodo y pulso probados fueron significativamente diferentes a los obtenidos con SW (Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ). En contraste a *S. franciscanus*, cuando las larvas competentes de *S. purpuratus* fueron expuestas a diferentes tiempos de exposición a una concentración de 100 mM de  $K^+$ , el 100% de las mismas se metamorfizó en todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, en el tratamiento de 6 h de exposición, la mortalidad fue cercana



**Figure 3.** Metamorphosis of *S. purpuratus* exposed to excess  $K^+$  (100 mM) for 0.25 to 12 h in SW. Bars indicate mean percentages of metamorphosis and mortality  $\pm 1$  SE ( $n = 3$  replicates/treatment) evaluated 24 after initial exposure to excess KCl. Diat = Diatom film of *Navicula inserta* inoculated 48 h before adding the larvae. SW = Sterilized seawater.

**Figura 3.** Metamorfosis de *S. purpuratus* expuesto a un exceso de  $K^+$  (100 mM) por 0.25 a 12 h en SW. Las barras indican los porcentajes medios de metamorfosis y mortalidad  $\pm 1$  DE ( $n = 3$  replicas/tratamiento), evaluadas 24 horas después de estar expuestas al exceso de KCl. Diat = Película de *N. inserta* inoculada 48 horas antes de añadir las larvas. SW = Agua de mar esterilizada.



**Figure 4.** Metamorphosis of *Lytechinus pictus* exposed to excess  $K^+$  (100 mM) for 0.25 to 12 h in SW. Bars indicate mean percentages of metamorphosis and mortality  $\pm 1$  SE ( $n = 3$  replicates/treatment), evaluated 24 h after initial exposure to excess KCl. SndA = sand from the bed where adults were kept in the laboratory. BioA = substratum coated with a marine biofilm from adult bed in laboratory. Bio = substratum coated with a marine biofilm. SW = Sterilized seawater.

**Figura 4.** Metamorfosis de *Lytechinus pictus* expuesto a un exceso de  $K^+$  (100 mM) por 0.25 a 12 h en SW. Las barras indican los porcentajes medios de metamorfosis y mortalidad  $\pm 1$  DE ( $n = 3$  replicas/tratamiento), evaluadas 24 horas después de estar expuestas al exceso de KCl. BioA = substrato cubierto con biopelícula del banco de adultos del laboratorio. Bio = substrato cubierto con una biopelícula marina. SW = Agua de mar esterilizada.



seawater tank (Tukey,  $P \leq 0.001$ ) However, mortality was also proportional to the length of exposure. Mortality increased drastically after one hour of exposure to excess  $K^+$  and near 100% of the larvae died in the treatments where they remained for 6 h or longer (fig. 4). Bacterial biofilms from running seawater tanks and adult bed sand kept in the laboratory, did not induce high metamorphosis percentages and were significantly lower than those observed with excess  $K^+$ .

## Discussion

Data provided herein on induction of metamorphosis with excess  $K^+$  showed that the three species of sea urchins tested, *S. franciscanus*, *S. purpuratus* and *Lytechinus pictus*, are induced to metamorphose by the presence of excess  $K^+$ . The response was dependent on the concentration and duration of exposure. Continuous exposure to 100 mM excess  $K^+$  induced 100% metamorphosis in the three species of sea urchins tested, but more than 90% of the metamorphosing larvae died after 24 h of continuous exposure to the solution. Apparently, although excess  $K^+$  is an effective inducer for the three species tested, it becomes toxic to the larvae during prolonged exposure. Percentages of metamorphosis in the presence of excess potassium were always higher than those obtained in the presence of the biofilm of the benthic diatom *N. inserta*. The lack of response to the diatom biofilm may be due to the short period of time allowed to the diatom to develop a film with the appropriate bacteria associated on the well. It is well known that larvae of sea urchins are induced to metamorphose in the presence of microbial films aged for as high as 75 days (Pearce and Scheibling, 1991).

The results of the present study expand the list of echinoderm species that are induced to metamorphose by the cation  $K^+$  (Cameron *et al.*, 1989; Pearce and Scheibling, 1994; Wang, 1998) and confirm previous results on *S. purpuratus* by Rowley (1989). In contrast with this author, in the present study maximum responses in *S. purpuratus* were obtained with 15-min exposure to 100 mM excess potassium.

Pulse exposure to excess  $K^+$  concentrations were highly effective to trigger metamorphosis with low mortality after 24-h exposure periods. Fifteen to 30-min exposures to 100 mM  $K^+$  were sufficient to trigger metamorphosis in the 3 species of sea urchins tested. Synchronous induction of metamorphosis using potassium, allow us to produce massive amounts of early juveniles at once. With other methods tested (like diatom biofilms), larvae undergo metamorphosis at different intervals and it is still very unpredictable the way the diatom film will behave as inducer. The final result of this differential response to the inducer, is an asynchronous population of early juveniles. Actually, the results obtained here regarding induction to metamorphosis in sea urchins using potassium, have been applied for massive production of early juveniles of *Loxechinus albus* in Chile, adding another sea urchin species responding to potassium. The use of potassium highly improved the

al 60% después de 24 h. Una exposición de 12 horas a esta misma concentración de  $K^+$  en exceso, mató a todas las postlarvas metamorfizadas, evaluadas a las 24 h de iniciado el experimento y 12 h después de cambiar la solución por SW fresca (fig. 3). Los tratamientos en los que las larvas se mantuvieron en SW y aquellos en los que éstas fueron expuestas a una biopelícula de *N. inserta* mostraron bajos porcentajes de metamorfosis. Con la biopelícula de la diatomea béntica *N. inserta*, los porcentajes más altos de metamorfosis fueron de sólo 12%.

La respuesta de *Lytechinus pictus* al exceso de  $K^+$  en agua de mar fue similar a la de *S. franciscanus* y *S. purpuratus*. Se observaron porcentajes de metamorfosis de hasta 83% para una exposición en pulso de 30 min con un exceso de  $K^+$  de 100 mM (fig. 4). Los porcentajes de metamorfosis con cualquier periodo de pulso experimentado fueron significativamente diferentes a los obtenidos con agua de mar esterilizada (Tukey,  $P \leq 0.02$ ) y con una película bacteriana de un tanque externo con agua de mar (Tukey,  $P \leq 0.001$ ). Sin embargo, la mortalidad también fue proporcional a la duración de la exposición. La mortalidad se incrementó drásticamente después de una hora de exposición al exceso de  $K^+$  y cerca del 100% de las larvas murieron en los tratamientos donde éstas permanecieron por 6 h o más (fig. 4). Las biopelículas bacterianas provenientes de tanques con flujo de agua de mar y arena de mantos de organismos adultos mantenidos en laboratorio no indujeron porcentajes altos de metamorfosis y fueron significativamente menores a los observados con exceso de  $K^+$ .

## Discusión

Los datos de inducción a la metamorfosis obtenidos con exceso de  $K^+$  mostraron que las tres especies de erizos de mar estudiadas, *S. franciscanus*, *S. purpuratus* y *Lytechinus pictus*, son inducidas a la metamorfosis por la presencia de un exceso de  $K^+$ . La respuesta dependió de la concentración y la duración de la exposición. La exposición continua a un exceso de  $K^+$  de 100 mM indujo la metamorfosis en el 100% de las tres especies de erizos probadas, pero más del 90% de las larvas que sufrieron metamorfosis murieron después de 24 h de exposición continua a la solución. Aunque el exceso de  $K^+$  es un inductor efectivo para las tres especies analizadas, este se vuelve tóxico para las larvas durante exposiciones prolongadas. Los porcentajes de metamorfosis en presencia de exceso de potasio siempre fueron más altos que los obtenidos en presencia de una biopelícula de la diatomea béntica *N. inserta*. La falta de respuesta a la película de diatomeas puede deberse al poco tiempo que se dió a la diatomea, en asociación con las bacterias apropiadas, para desarrollar una película en las cajas de Petri de depósitos múltiples. Es bien conocido que las larvas de erizos de mar son inducidos a la metamorfosis en presencia de películas microbianas formadas con hasta 75 días de antelación (Pearce y Scheibling, 1991).

Los resultados del presente estudio amplian la lista de equinodermos que son inducidos a la metamorfosis por el catión  $K^+$  (Cameron *et al.*, 1989; Pearce y Scheibling, 1994; Wang,



percentage of competent larvae of *L. albus* that synchronously underwent metamorphosis (Pers. comm. Sergio Olave. Instituto de Fomento Pesquero, División de Acuicultura, Chiloe, Chile).

Our results contrast with the data showed by Wendt and Woollacott (1995) for 3 species of bryozoans, and by Pechenik and Heyman (1987) for the gastropod *Crepidula fornicata*, in which pulse exposures to excess  $K^+$  (5 to 30 min to 10 mM  $K^+$  for bryozoans, and up to 5 h to 5–50 mM in *C. fornicata*) did not trigger metamorphosis. Nevertheless, the different individual responses to artificial inducers by competent larvae belonging to different phyla may be an expectable result given the diverse life-history strategies among marine invertebrates. In this respect, competent larvae of the three species of sea urchins tested seem particularly sensitive to excess  $K^+$  as an artificial inducer, triggering metamorphosis synchronously.

Apparently, the age at which the larvae attain “competency” is important when larvae respond to excess  $K^+$  as metamorphic inducer. We notice that, apparently, older larvae with bigger juvenile rudiment were able to complete metamorphosis and to develop faster all the early juvenile structures including long spines, in comparison with younger competent larvae. In the present work, the rudiment appearance, including the presence of tube feet and pedicelaria, was the only criterion used to recognize competency of the larvae of the different species tested, although we did not quantify individual differences among larvae. Excess potassium ( $K^+$ ) has been proposed to induce metamorphosis by depolarization of externally accessible excitable cells (Baloun and Morse, 1984; Yool *et al.*, 1986; Carpizo-Ituarte and Hadfield, 1998), presumably those with receptors for external metamorphic inducers (Hadfield *et al.*, 2000). However, in most of the experiments carried out by different authors, including the present work, whole larvae are bathed in the seawater with high potassium concentrations, and these ion could be acting on the entire nervous system, downstream from the primary chemosensory cells (Todd *et al.*, 1991). Recent results on the effect of  $K^+$  and  $Cs^+$  on nudibranch *Phestilla sibogae* by Hadfield *et al.* (2000) support the hypothesis that  $K^+$  is acting downstream from the primary sensory cells bearing the receptors for metamorphic inducers. However, a simultaneous effect of the ion on primary sensory cells and downstream, is still a possibility that needs to be clarified. Although we still do not understand the mechanism by which excess  $K^+$  induces metamorphosis in any marine invertebrate larvae, it represents a useful tool to induce metamorphosis synchronously in sea urchin species in culture conditions and to investigate the metamorphic signal transduction pathways and gene expression involved during echinoderm metamorphosis.

### Acknowledgments

We thank Agustín Hernández and Claudia Moreno-Brizuela for their help with the culture of the larvae until they reach competency, and the rest of the embryology laboratory

(1998) y confirman los resultados previos obtenidos por Rowley (1989) con *S. purpuratus*. En contraste con este autor, en este estudio las respuestas máximas con *S. purpuratus* fueron obtenidas con una exposición a un exceso de potasio de 100 mM por 15 min.

Las exposiciones en pulsos a concentraciones de exceso de  $K^+$ , fueron muy efectivas para estimular la metamorfosis con bajas mortalidades después de 24 h de la exposición. Las exposiciones de 15 y 30 min, a un exceso de  $K^+$  de 100 mM, fueron suficientes para iniciar la metamorfosis en las 3 especies de erizos de mar evaluadas. La inducción sincronizada a la metamorfosis utilizando potasio, permite producir cantidades masivas de juveniles tempranos en una sola ocasión. Con otros métodos probados (como las películas de diatomeas), las larvas llevan a cabo la metamorfosis a diferentes tiempos y todavía es impredecible la forma en que la biopelícula de diatomeas actúa como inductor. El resultado final de esta respuesta diferenciada al inductor es una población asincrónica de juveniles tempranos. De hecho, los resultados aquí presentados para inducir la metamorfosis en erizos marinos utilizando potasio, han sido usados para la producción masiva de juveniles tempranos de *Loxechinus albus* en Chile, lo que añade una especie más que responde al potasio. El uso del potasio elevó en gran medida el porcentaje de larvas competentes de *L. albus* que iniciaron metamorfosis de manera sincronizada (com. pers. Sergio Olave. Instituto de Fomento Pesquero, División de Acuicultura, Chiloe, Chile).

Los resultados del presente estudio contrastan con los datos mostrados por Went y Woollacott (1995) para 3 especies de bryozoarios y por Pechenik y Heyman (1987) para el gástrópodo *Crepidula fornicata*, en los que las exposiciones a pulsos de exceso de  $K^+$  (de 5 a 30 min a 10 mM de  $K^+$  para los bryozoarios y de hasta 5 h a 5–50 mM en *C. fornicata*) no indujeron metamorfosis alguna. Sin embargo, dadas las diversas estrategias en las historias de vida entre los invertebrados marinos, cabe esperar las distintas respuestas individuales a inductores artificiales mostradas por las larvas competentes de diferentes fila. A este respecto, las larvas competentes de las tres especies de erizos de mar probadas parecen particularmente sensibles al exceso de  $K^+$  como un compuesto artificial que induce a la metamorfosis de manera sincronizada.

Aparentemente, la edad a la que la larva alcanza la “competencia” es importante cuando la larva responde a un exceso de  $K^+$  como un inductor a la metamorfosis. Notamos que, en apariencia, las larvas más viejas con mayor rudimento juvenil fueron capaces de completar la metamorfosis y desarrollar más rápido todas las estructuras juveniles, incluyendo las espinas largas, en comparación con las larvas competentes más jóvenes. En el presente trabajo, la aparición del rudimento, caracterizado por la presencia de los pies ambulacrales y pedicelaria, fue el único criterio utilizado para reconocer la competencia de las larvas de las distintas especies estudiadas, y no se cuantificaron las diferencias individuales entre las larvas. Se ha propuesto que el exceso de potasio ( $K^+$ ) induce a la metamorfosis por la despolarización de las células excitables más

group of the Instituto de Investigaciones Oceanológicas for their support during the experimental work. This research was supported by CONACYT grant I33391-B to EC-I.

## References

- Baloun, A.J. and Morse, D.E. (1984). Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (Gastropoda). Biol. Bull., 167: 124–138.
- Cameron, R.A. and Hinegardner, R.T. (1974). Initiation of metamorphosis in laboratory cultured sea urchins. Biol. Bull., 146: 335–342.
- Cameron, R. A., Tosteson, T.R. and Hensley, V. (1989). The control of sea urchin metamorphosis: ionic effects. Develop. Growth & Differ., 31: 589–594.
- Carpizo-Ituarte, E. and Hadfield, M.G. (1998). Stimulation of metamorphosis in the polychaete *Hydroides elegans* Haswell (Serpulidae). Biol. Bull., 194: 14–24.
- Hadfield, M.G. (1998). Research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present and future. Biofouling, 12: 9–29.
- Hadfield, M.G., Meleshkevitch, D.E. and Boudko, D.Y. (2000). The apical sensory organ of a gastropod veliger is a receptor for settlement cues. Biol. Bull., 198: 67–76.
- Müller, W.A. und Buchal, G. (1973). Metamorphose–Induktion bei Planularven: II Induktion durch monovalente Kationen: Die Bedeutung des Gibbs–Donnan–Verhältnisses und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>–ATPase. Roux's Arch. Dev. Biol., 173: 122–135.
- Naidenko, T. Kh. (1996). Induction of metamorphosis of two species of sea urchin from Sea of Japan. Mar. Biol., 126: 685–692.
- Pearce, C.M. and Scheibling, R.E. (1991). Effect of macroalgae, microbial films, and conspecifics on the induction of metamorphosis of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 147: 147–162.
- Pearce, C.M. and Scheibling, R.E. (1994). Induction of metamorphosis of larval echinoids (*Strongylocentrotus droebachiensis* and *Echinarachnius parma*) by potassium chloride (KCl). Invert. Rep. Devel., 26: 213–220.
- Pawlik, J.R. (1990). Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: sabellaridae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. Bull. Mar. Sci., 46: 512–536.
- Pechenik, J.A. and Heyman, W.D. (1987). Using KCl to determine the size of competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 112: 27–38.
- Preciado-Pinedo, M. (2000). KCl, GABA y L-glutamina como inductores a la metamorfosis en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis de Maestría, FCM. UABC. Ensenada, B.C. 51 pp.
- Rowley, R.J. (1989). Settlement and recruitment of sea urchins (*Strongylocentrotus* spp.) in a sea-urchin barren ground and a kelp bed: are populations regulated by settlement or post-settlement processes? Mar. Biol., 100: 485–494.
- Strathmann, M.F. (1987). Phylum Echinodermata: Class Echinoidea. In: M.F. Strathmann, (ed.), Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. Univ. of Washington Press, Seattle, Washington, pp. 511–534.
- Todd, C.D., Bentley, M.G. and Havenhand, J.N. (1991). Larval metamorphosis of the opisthobranch mollusc *Adalaria proxima* externamente accesibles (Baloun y Morse, 1984; Yool *et al.*, 1986; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998), presumiblemente las que cuentan con receptores externos para inductores de la metamorfosis (Hadfield *et al.*, 2000). Sin embargo, en la mayoría de los experimentos llevados a cabo por distintos autores, incluyendo el presente estudio, todas las larvas se sumergen en agua de mar con altas concentraciones de potasio y este ión puede estar actuando en todo el sistema nervioso, además de las células quimiosensoras (Todd *et al.*, 1991). Resultados recientes del efecto del K<sup>+</sup> y el Cs<sup>+</sup> en el nudibranco *Phestilla sibogae* por Hadfield *et al.* (2000) sustentan la hipótesis de que el K<sup>+</sup> actúa a partir de las células sensoriales primarias las cuales poseen los receptores para inductores a la metamorfosis. Sin embargo, un efecto simultáneo del ión en las células sensoriales primarias y, al mismo tiempo, en otras células es aún una posibilidad que debe ser aclarada. Aunque aún no comprendemos el mecanismo por el cual el exceso de K<sup>+</sup> induce la metamorfosis en algunas larvas de invertebrados marinos, este representa una herramienta útil para inducir la metamorfosis de manera sincronizada en las especies de erizo de mar en condiciones de cultivo, y para investigar las rutas de transducción y expresión genética involucradas durante la metamorfosis de equinodermos.

## Agradecimientos

Agradecemos a Agustín Hernández y Claudia Moreno-Brizuela por su ayuda con el cultivo de las larvas hasta alcanzar la competencia, y al resto del grupo del laboratorio de embriología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas por su apoyo durante el trabajo experimental. Esta investigación fue apoyada por el CONACYT bajo el proyecto I33391-B a EC-I.

Traducción al español por Adrián R. López-González.

- (Gastropoda: Nudibranchia): the effects of choline and elevated potassium ion concentration. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 71: 53–72.
- Wang, B. (1998). Application and effects of potassium chloride (KCl) on rearing sea urchin seedling. Shandong fish., 15 (3): 21–23 (A).
- Wendt, D.E. y Woollacott, R.M. (1995). Induction of larval settlement by KCl in three species of Bugula (Bryozoa). Invertebr. Biol., 114: 345–351.
- Woollacott, R. M. and Hadfield, M.G. (1996). Induction of metamorphosis in larvae of a sponge. Invert. Biol., 115: 257–262.
- Yazaki, I. and Harashima, H. (1994). Induction of metamorphosis in the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*, using L-glutamine. Zool. Sci., 11: 253–260.
- Yazaki, I. (1995). Quantitative analysis of metamorphosis induced by L-glutamine in embryos of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. Zool. Sci., 12: 105–112.
- Yool, A.J., Grau, S.M., Hadfield, M.G. Jensen, R.A., Markell, D.A., and Morse, D.E. (1986). Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol. Bull., 170: 255–266.