# **BOLETÍN** INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

ISSN 0458-7766

Volumen 33, Número 2





Julio - Diciembre 2018 Callao, Perú



Ministerio de la Producción

# **OBSERVATIONS ON EMBRYOS AND EMBRYONIC DEVELOPMENT** FROM AN EGG MASS OF THE JUMBO SQUID Dosidicus gigas SPAWNED UNDER CAPTIVE CONDITIONS

### **OBSERVACIONES SOBRE EMBRIONES Y DESARROLLO EMBRIONARIO A PARTIR** DE UNA MASA DE HUEVOS DEL CALAMAR GIGANTE Dosidicus gigas DESOVADA EN CAUTIVERIO

Mitsuo Sakai\*1 Dharmamony Vijai<sup>1</sup> Carmen Yamashiro<sup>2</sup> Toshie Wakabayashi<sup>3</sup>

#### ABSTRACT

SAKAI M, VIJAI D, YAMASHIRO C, WAKABAYASHI T. 2018. Observations on embryos and embryonic development from an egg mass of the jumbo squid Dosidicus gigas spawned under captive conditions. Bol Inst Mar Peru. 33(2): 153-159.- Egg masses were spawned by a jumbo squid Dosidicus gigas (mantle length 37.5 cm) held in a tank (500 L) on board the R/V Kaiyo Maru during a joint Japan-Peru cruise in Peruvian waters during December 2011-February 2012. Part of an egg mass was collected and incubated in an aquarium (10 L) maintained at 20 °C. The eggs had a unique jelly envelope surrounding the chorion. The diameter of the jelly envelope was more than twice the diameter of chorion. It remained clearly visible until the embryos reached developmental stage 18. Most of the eggs were fertilized and hatched (Stage 30) 6.5 days after spawning at 20 °C. Keywords: egg mass, captive spawning, Dosidicus gigas

#### RESUMEN

SAKAI M, VIJAI D, YAMASHIRO C, WAKABAYASHI T. 2018. Observaciones sobre embriones y desarrollo embrionario a partir de una masa de huevos de calamar gigante Dosidicus gigas desovada en cautiverio. Bol Inst Mar Perú. 33(2): 153-159.- Masas de huevos fueron desovadas por un calamar gigante Dosidicus gigas (longitud de manto 37,5 cm) mantenido en un tanque de 500 litros, a bordo del BIC Kaiyo Maru durante un crucero conjunto de Japón-Perú en aguas peruanas, entre diciembre 2011 y febrero 2012. Parte de la masa de huevos se recolectó e incubó en un acuario de 10 litros y conservó a 20 °C. Los huevos tenían una envoltura gelatinosa única alrededor del corion. El diámetro de la envoltura gelatinosa era más del doble del diámetro del corion, el que permaneció claramente visible hasta que los embriones alcanzaron la etapa de desarrollo 18. La mayoría de los huevos estaban fertilizados y eclosionaron (Etapa 30) 6,5 días después del desove a 20 °C. PALABRAS CLAVE: masa de huevos, desove en cautiverio, Dosidicus gigas

## 1. INTRODUCTION

The Ommastrephidae is one of the largest families of oegopsid squids, with many commercially as well as ecologically important species, yet little information is available about the early life stages of the family. Our knowledge of the embryonic development of ommastrephids squids has improved in recent years owing to the development of artificial fertilization techniques (Sakurai et al. 1995, Sakai et al. 2011, VILLANUEVA *et al.* 2012).

However. direct observations of embryonic development within spawned egg masses have been limited and partial because ommastrephid egg masses are tenuous, transparent, and short-lived (VIJAI 2016); and hence have rarely been reported from the wild (Naef 1928, Laptikhovsky & Murzov 1990, O'Shea et al. 2004, STAAF et al. 2008, BIRK et al. 2016). The only detailed study of an ommastrephid egg mass in the wild is the classic work of NAEF (1928) illustrating the embryonic development of the southern shortfin squid, Illex coindetii (Vérany, 1839).

## 1. INTRODUCCIÓN

Ommastrephidae es una de las familias más grandes de calamares oegópsidos, con muchas especies de importancia comercial y ecológica, aunque se dispone de poca información sobre las primeras etapas de la vida de esta familia. Nuestro conocimiento sobre el desarrollo embrionario de los calamares ommastréfidos ha mejorado en los últimos años, debido al desarrollo de técnicas de fertilización artificial (SAKURAI et al. 1995, SAKAI et al. 2011, VILLANUEVA et al. 2012).

Sin embargo, las observaciones directas del desarrollo embrionario dentro de las masas de huevos desovados han sido limitadas y parciales, debido a que esas masas son tenues, transparentes y de corta vida (VIJAI 2016) y raras veces se han reportado en el medio silvestre (NAEF 1928, LAPTIKHOVSKY Y MURZOV 1990, O'SHEA et al. 2004, Staaf et al. 2008, Birk et al. 2016). El único estudio detallado de una masa de huevos de ommastréfidos en el medio silvestre es el clásico trabajo de NAEF (1928) que ilustra el desarrollo embrionario del calamar de aleta corta del sur Illex coindetii (Vérany, 1839).

Tohoku National Fisheries Research Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Samemachi, Hachinohe, 031-0841, Japan Unidad de Investigación en Invertebrados Marinos, Instituto del Mar del Perú, Esquina Gamarra y General Valle s/n, Chucuito, Callao, Perú Department of Fisheries Science and Technology, National Fisheries University, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan

Corresponding author: sakaimit@affrc.go.jp

In recent years, captive experiments have allowed observations on the embryonic development within egg masses for several ommastrephid squids, including *Todarodes pacificus* (HAMABE 1962, BOWER & SAKURAI 1996, PUNEETA *et al.* 2015), *Illex coindetii* (BOLETZKY *et al.* 1973), *Illex illecebrosus* (O'DOR & DURWARD 1979, DURWARD *et al.* 1980, O'DOR *et al.* 1982, BALCH *et al.* 1985), *Sthenoteuthis oualaniensis* (CHESLIN & GIRAGOSOV 1993), and *Dosidicus gigas* (STAAF *et al.* 2008).

The jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) is the largest and one of the most abundant of the ommastrephid squids (NIGMATULLIN *et al.* 2001). Its embryonic development has been documented from both wild egg masses (STAAF *et al.* 2008, BIRK *et al.* 2016) and laboratory experiments (YATSU *et al.* 1999, STAAF *et al.* 2008, STAAF *et al.* 2011). Such studies can provide information useful for understanding fluctuations of stock abundance in *D. gigas* (YATSU *et al.* 1999). This report describes an egg mass that was spawned on board a research vessel and further observations on their embryonic development.

#### 2. MATERIAL AND METHODS

Investigations were conducted on board the R/V Kaiyo Maru during a Japan-Peru joint research cruise carried out from December 2011 to February 2012 in the Peruvian EEZ. The priority objectives of the cruise were to collect data on D. gigas recruitment and to conduct biotelemetry tag-andrelease experiments. For tagging, adult squids were captured with jigs on hand lines. Typically, the squid were released immediately (10-15 min) after they were tagged. For details on the biotelemetry experiments, see SAKAI (2012). Occasionally, they were held in an onboard polycarbonate-glass tank (500 L), to observe their condition before release. The tank was oxygenated with constantly running, filtered surface sea water (20 °C). On December 22, 2011, one female squid (37.5 cm in mantle length) held in the tank spawned a translucent egg mass filled almost the tank and she died the next day. Postmortem examination was conducted to evaluate the condition of its reproductive organs.

Part of an egg mass cut out from the whole egg masse was incubated in a small (10 L) aquarium maintained at 20 °C in an on-board laboratory. Embryonic development was recorded based on the staging scheme and definitions of WATANABE *et al.* (1996) and SAKAI *et al.* (1998) proposed for the ommastrephid squids *Todarodes pacificus* and *Illex argentinus*, respectively. En los últimos años, los experimentos en cautiverio han permitido observar el desarrollo embrionario dentro de las masas de huevos de varios calamares ommastréfidos, incluyendo a *Todarodes pacificus* (HAMABE 1962, BOWER Y SAKURAI 1996, PUNEETA *et al.* 2015), *Illex coindetii* (BOLETZKY *et al.* 1973), *Illex illecebrosus* (O'DOR Y DURWARD 1979, DURWARD *et al.* 1980, O'DOR *et al.* 1982, BALCH *et al.* 1985), *Sthenoteuthis oualaniensis* (CHESLIN Y GIRAGOSOV 1993) y *Dosidicus gigas* (STAAF *et al.* 2008).

El calamar gigante *D. gigas* (d'Orbigny, 1835) es el más grande y uno de los más abundantes de los calamares ommastréfidos (NIGMATULLIN *et al.* 2001). Su desarrollo embrionario ha sido documentado tanto a partir de masas de huevos silvestres (STAAF *et al.* 2008, BIRK *et al.* 2016) como de experimentos de laboratorio (YATSU *et al.* 1999, STAAF *et al.* 2008, STAAF *et al.* 2011). Dichos estudios pueden proporcionar información útil para comprender las fluctuaciones de la abundancia del stock de *D. gigas* (YATSU *et al.* 1999). El presente trabajo describe una masa de huevos que fue desovada a bordo de un buque de investigación y observaciones adicionales sobre su desarrollo embrionario.

### 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron investigaciones a bordo del BIC Kaiyo Maru durante un crucero conjunto de investigación Japón -Perú realizado entre diciembre 2011 y febrero 2012 en la Zona Económica peruana. Los objetivos prioritarios del crucero fueron recopilar datos sobre el reclutamiento de D. gigas y realizar experimentos de biotelemetría de marcado y liberación. Para el marcado, se capturaron calamares adultos con poteras en líneas de mano. Por lo general, los calamares fueron liberados inmediatamente (10-15 minutos) después de ser marcados. Para más detalles sobre los experimentos de biotelemetría véase SAKAI (2012). Ocasionalmente, en un tanque de policarbonato de 500 L de capacidad, se mantuvieron los calamares para observar su estado, antes de ser liberados. El tanque fue oxigenado y mantenido con agua de mar filtrada y en constante movimiento (20 °C). El 22 de diciembre del 2011, una hembra de calamar (37,5 cm de longitud de manto) depositada en el tanque, desovó una masa de huevos translúcida que llenó casi el tanque, muriendo al día siguiente. Se realizó un examen post-mortem para evaluar el estado de sus órganos reproductores.

De la masa de huevos, se cortó una parte que fue incubada en un acuario pequeño (10 L) y mantenida a 20 °C en el laboratorio del barco. Se registró el desarrollo embrionario basado en el esquema y definiciones de estadios de WATANABE *et al.* (1996) y SAKAI *et al.* (1998) propuestas para los calamares ommastréfidos *Todarodes pacificus* e *Illex argentinus,* respectivamente.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Spawning of a shapeless and translucent egg mass filled almost the tank might have been stress induced and abnormal behavior because healthy *D. gigas* are known to spawn bigger (>30 cm in diameter) egg masses (STAAF *et al.* 2008, BIRK *et al.* 2016). The limited space in the small (500 L) tank and manual handling before releasing into the tank might have induced stress in the animal. Some egg masses were broken and macerated to jelly blobs, probably by the swimming squid inside the tank.

Most of the eggs in the tank were unfertilized. Fertilization in the ommastrephids takes place while spawning (HAMABE 1962, O'Dor & DAWE 2013, VIJAI 2016), and the low fertilization rate in the present study might have been due to the anomalous spawning conditions. In the fertilized eggs, normal embryonic development was observed from the 4th cleavage phase (16 cells, Stage 7) until hatching (Stage 30, Fig. 1). The developing embryos had fully expanded chorions and were surrounded by a jelly envelope (Fig. 2). The envelope was observed until Stage 18 and was similar to the spherical envelope reported by STAAF et al. (2008). At 20 °C, the eggs hatched 6.5 days after they were spawned (Fig. 3). This embryonic development duration was similar to that of Illex argentinus incubated at 20 °C (SAKAI et al. 1999a, Sакат et al. 1999b).

Post-mortem examination of the spawned female revealed many eggs were still present in the ovary and oviducts. The anterior ends of the nidamental glands were attenuated and slightly translucent similar to the nidamental glands in a spawned *D. gigas* female reported by STAAF *et al.* (2008). The presence of eggs in the oviduct indicated the possibility of incomplete or abnormal spawning.

Since the present study was of second priority on board, detailed observations on the hatched paralarvae were not possible. Future investigations could be designed to observe and record the embryonic development within the egg mass. Recently, information about *D. gigas* egg masses and the effects of temperature on embryonic development has increased (YATSU *et al.* 1999, STAAF *et al.* 2008, STAAF *et al.* 2011, BIRK *et al.* 2016). But further research is still needed to elucidate the survival of paralarvae and to determine their early prey. Well-designed on-board captive experiments could provide answers to these questions in near future, not just for *D. gigas*, but for all ommastrephids.

# 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desove de una masa de huevos sin forma y translúcida, que casi llenó el tanque, podría haber sido inducido por el estrés y un comportamiento anormal, ya que es sabido que las *D. gigas* sanas desovan masas de huevos más grandes (>30 cm de diámetro) (STAAF *et al.* 2008, BIRK *et al.* 2016). El espacio limitado en el tanque de 500 litros y la manipulación antes de liberar al ejemplar, pueden haber inducido estrés en el animal. Algunas masas de huevos se rompieron y maceraron hasta formar gotas gelatinosas, probablemente causadas por el calamar que nadaba en el tanque.

La mayoría de los huevos en el tanque no estaban fertilizados. La fertilización en los ommastréfidos tiene lugar durante el desove (HAMABE 1962, O'DOR y DAWE 2013, VIJAI 2016) y la baja tasa de fertilización en el presente estudio podría deberse a las condiciones anómalas de desove. En los ovocitos fecundados, se observó un desarrollo embrionario normal desde la 4ta fase de segmentación (16 células, estadio 7) hasta la eclosión (estadio 30, Fig. 1). Los embriones en desarrollo tenían coriones completamente expandidos y estaban rodeados por una envoltura gelatinosa (Fig. 2). La envoltura fue observada hasta el estadio 18 y fue similar a la envoltura esférica reportada por STAAF et al. (2008). A 20 °C, los huevos eclosionaron 6,5 días después de su desove (Fig. 3). Esta duración del desarrollo embrionario fue similar a la del Illex argentinus incubado a 20 °C (Sакаi et al. 1999а, Sакаi et al. 1999b).

El examen post-mortem de la hembra desovada, reveló que todavía había muchos óvulos presentes en el ovario y los oviductos. Los extremos anteriores de las glándulas nidamentales estaban atenuados y ligeramente translúcidos, similares a las glándulas nidamentales en una hembra desovada de *D. gigas* reportada por STAAF *et al.* (2008). La presencia de huevos en el oviducto indica la posibilidad de desove incompleto o anormal.

Dado que el presente estudio tenía una prioridad secundaria a bordo, no fue posible hacer observaciones detalladas sobre las paralarvas eclosionadas. Se podrían diseñar investigaciones futuras para observar y registrar el desarrollo embrionario dentro de la masa de huevos. Recientemente, ha aumentado la información sobre las masas de huevos de D. gigas y los efectos de la temperatura en el desarrollo embrionario (YATSU et al. 1999, STAAF et al. 2008, STAAF et al. 2011, BIRK et al. 2016). Sin embargo, aún se necesitan más investigaciones para dilucidar la supervivencia de las paralarvas y para determinar su presa temprana. Experimentos en cautiverio, bien diseñados, podrían proporcionar respuestas a estas preguntas en un futuro próximo, no sólo para D. gigas, sino para todos los Ommastrephidae.

#### ANNEXED



Figure 1. Embryonic developmental stages of *Dosidicus gigas* from Stage 7 (fourth 4 cleavage) to Stage 30 (hatching stage). Stage 7; animal pole view, Stages 18&30; lateral 5 views, Stages 19–28; ventral views

Figura 1.- Etapas de desarrollo embrionario de *Dosidicus gigas* desde el estadio 7 (cuarta segmentación) al estadio 30 (etapa de eclosión. Estadio 7: vista del polo animal, Estadios 18 - 30: vistas laterales, Estadios 19-28: vistas ventrales



Figure 2. *Dosidicus gigas* embryo surrounded by a chorion and a jelly envelope. The 7 envelope remained until the embryo reached stage 18

Figura 2.- Embrión de *Dosidicus gigas* rodeado de un corion y una envoltura gelatinosa. La envoltura permaneció hasta que el embrión alcanzó el estadio 18



Figure 3. Timeline of embryonic developmental stages at 20°C for *Dosidicus gigas* (circles) and the ommastrephid squid *Illex argentinus* (dashed line, from SAKAI et al. 11 1999b)

Figura 3.- Cronología de las etapas de desarrollo embrionario a 20 °C para *Dosidicus gigas* (círculos) y para *Illex argentinus* (línea punteada, de SAKAI et al. 1999b)

#### Acknowledgments

This study was conducted during a cooperative research cruise funded by the Fisheries Research and Education Agency of Japan and the Instituto del Mar del Peru (IMARPE). We express our sincere thanks to the research staffs of the Fisheries Research and Education Agency and IMARPE, and to the captain, officers, and crew of the R/V Kaiyo Maru. This work was supported by the project on the evaluation of status of international fishery resources by the Fisheries Agency of Japan and "KAKENHI" Grant-in-Aid for Scientific Research-C (26450276).

#### 4. **REFERENCES/REFERENCIAS**

- BALCH N, O'DOR R K, HELM P. 1985. Laboratory rearing of rhynchoteuthions of the ommastrephid squid *Illex illecebrosus* (Mollusca: Cephalopoda). Vie Milieu. 35: 243–246.
- BIRK M A, PAIGHT C, SEIBEL B A. 2016. Observations of multiple pelagic egg masses from small-sized jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California. J Nat Hist. doi: 10.1080/00222933.2016.1209248
- BOLETZKY S VON, ROWE L, AROLES L. 1973. Spawning and development of the eggs, in the laboratory of *Illex coindetii*. The Veliger 15: 257–258.
- BOWER J R, SAKURAI Y. 1996. Laboratory observations on *Todarodes pacificus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) egg masses. Am Malacol Bull. 13: 65–71.
- CHESLIN M V, GIRAGOSOV V Y E. 1993. The egg mass and embryonic development of the purple squid *Stenoteuthis oualaniensis* (The gigantic Arabian form) under experimental conditions. Oceanology. 33: 98– 101.
- DURWARD R D, VESSEY E, O'DOR R K, AMARATUNGA T. 1980. Reproduction in the squid, *Illex illecebrosus*: first observations in captivity and implications for the life cycle. Int Comm Northwest Atl Fish Sel Pap. 6: 6–13.
- HAMABE M. 1962. Embryological studies on the common squid *Ommastrephes sloani pacificus* Steenstrup, in the southwestern waters of the Sea of Japan. Bull Japan Sea Reg Fish Res Lab. 10: 1–45.
- LAPTIKHOVSKY V V, MURZOV S. 1990. Epipelagic egg mass of the squid *Sthenoteuthis pteropus* collected in the tropical eastern Atlantic. Biol Morya. 3: 62–63.
- NAEF A. 1928. Die Cephalopoden. Fauna Flora Golf Neapel. 35: 1–357.
- NIGMATULLIN C M, NESIS K, ARKHIPKIN A I. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fish Res. 54: 9–19.
- O'Dor R K, Durward R D. 1979. A preliminary note on *Illex illecebrosus* larvae hatched from eggs spawned in captivity. Proc Biol Soc Wash. 91: 1076–1078.
- O'DOR R K, BALCH N, FOY E A, *et al.* 1982. Embryonic development of the squid, *Illex illecebrosus*, and effect of temperature on development rates. J Northw Atl Fish Sci. 3: 41 45.

#### Agradecimientos

Este estudio fue realizado durante un crucero de investigación cooperativa, financiado por la Agencia de Investigación y Educación Pesquera de Japón y el Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Expresamos nuestro sincero agradecimiento al personal de investigación de la Agencia y del IMARPE, así como al capitán, oficiales y tripulación del BIC Kaiyo Maru. Este trabajo fue apoyado por el proyecto de evaluación de la situación de los recursos pesqueros internacionales de la Agencia de Pesca de Japón y la subvención "KAKENHI" para la investigación científica-C (26450276).

- O'DOR R K, DAWE E G. 2013. *Illex illecebrosus*, northern short-finned squid. In: Rosa R, Pierce GJ, O'Dor RK (eds) Advances in Squid Biology, Ecology and Fisheries. Part II – Oegopsid Squids. Nova Science Publishers, Inc. New York. 73–108 pp.
- O'SHEA S, BOLSTAD K S, RITCHIE P A. 2004. First records of egg masses of *Nototodarus gouldi* McCoy, 1888 (Mollusca: Cephalopoda: Ommastrephidae), with comments on egg mass susceptibility to damage by fisheries trawl. New Zeal J Zool. 31: 161–166.
- PUNEETA P, VIJAI D, Yoo H-K, *et al.* 2015. Observations on the spawning behavior, egg masses and paralarval development of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus* in a laboratory mesocosm. J Exp Biol. 218: 3825–3835.
- SAKAI M, BRUNETTI NE, ELENA B, SAKURAI Y. 1998. Embryonic development and hatchlings of *Illex argentinus* derived from artificial fertilization. South African J Mar Sci. 20: 255–265.
- SAKAI M, BRUNETTI N E, IVANOVIC M, et al. 1999a. Embryonic development of *Illex argentinus* from artificial fertilization. In: Seminario final del proyecto: Avances en métodos y tecnología aplicados a la investigación pesquera. JICA-INIDEP, Mar del Plata, Argentina. 38– 39 pp.
- SAKAI M, BRUNETTI N E, IVANOVIC M, *et al.* 1999b. Embryonic development and mortality of *Illex argentinus* as a function of temperature. In: Seminario final del proyecto: Avances en métodos y tecnología aplicados a la investigación pesquera. JICA-INIDEP, Mar del Plata, Argentina, pp 35–37.
- SAKAI M, BRUNETTI N E, IVANOVIC M, et al. 2011. Useful techniques for artificial fertilization of the ommastrephid squid *Illex argentinus*. Japan Agric Res Q. 45: 301–308.
- SAKAI M. 2012. Kaiyo Maru cruise report (KY11-4): Recruitment of the jumbo flying squid, *Dosidicus gigas*, in the EEZ of Peru and the off Peru waters from December 2011 to February 2012. p. 202.
- SAKURAI Y, YOUNG R E, HIROTA J, et al. 1995. Artificial fertilization and development through hatching in the oceanic squids *Ommastrephes bartramii* and *Sthenoteuthis oualaniensis* (Cephalopoda: Ommastrephidae). The Veliger. 38: 185 – 191.

- STAAF D J, ZEIDBERG L D, GILLY W. 2011. Effects of temperature on embryonic development of the Humboldt squid *Dosidicus gigas*. Mar Ecol Prog Ser. 441: 165 – 175.
- STAAF D J, CAMARILLO-COOP S, HADDOCK S H D, et al. 2008. Natural egg mass deposition by the Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California and characteristics of hatchlings and paralarvae. J Mar Biol Assoc United Kingdom. 88: 759 – 770.
- VIJAI D. 2016. Egg masses of flying squids (Cephalopoda: Ommastrephidae). J Shellfish Res. 35: 1007–1012.
- VILLANUEVA R, STAAF D J, ARGÜELLES J, *et al.* 2012. A laboratory guide to *in vitro* fertilization of oceanic squids. Aquaculture. 342–343: 125–133.
- WATANABE K, SAKURAI Y, SEGAWA S, OKUTANI T. 1996. Development of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*, from fertilized egg to rhynchoteuthion paralarva. Am Malacol Bull. 13: 73 – 88.
- YATSU A, TAFUR R, MARAVI C. 1999. Embryos and rhynchoteuthion paralarvae of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) obtained through artificial fertilization from Peruvian waters. Fish Sci. 65: 904–908.