



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Biología reproductiva, desarrollo embrionario y larval de *Siphonaria lessonii*  
(Blainville, 1824) en el área costera de la provincia de Buenos Aires**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Henrique Knack de Almeida

Directora de Tesis: Dra. Juliana Giménez

Consejeras de Estudios: Dra. Graciela Esnal y Dra. Laura Susana López Greco

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada IBBEA, CONICET-UBA.

Ciudad autónoma de Buenos Aires, 30 de marzo de 2021.

## Resumen

*Siphonaria lessonii* es la única especie de gasterópodo pulmonado y herbívoro dominante en la zona supra y mediolitoral de la costa bonaerense. La presencia de estructuras artificiales, como el muelle de pesca de Villa Gesell, proporcionan un sustrato para la colonización y el desarrollo de *S. lessonii*, modificando su distribución así como la estructura ecológica de la comunidad. El presente trabajo aporta información de la biología reproductiva de esta especie para lo cual se describe el aparato reproductivo, la ultraestructura del espermatozoide, el ciclo reproductivo, la talla de primera madurez sexual y el desarrollo embrionario y larval. Se examinó histológicamente el aparato reproductor de *S. lessonii* y se caracterizó el espermatozoide por tener un acrosoma cónico, con un núcleo alargado y con inserción continua del flagelo desde el núcleo que continúa en la pieza media seguida de la pieza de glucógeno hasta la pieza final. La caracterización gametogénica indicó la presencia simultánea de gametos femeninos y masculinos mensualmente en individuos adultos y evidenció periodos de desove desde los meses de invierno hasta el fin del verano austral con un incremento entre los meses de octubre y febrero. Se determinaron las tallas mínimas de madurez sexual en 7,60 mm para la porción masculina mientras que para la femenina 8,00 mm, definiendo a *S. lessonii* con un hermafroditismo de tipo protándrico simultáneo. Se describió la oviposición y el desarrollo embrionario y larval en dos rangos de temperatura. El desarrollo es indirecto resultando en la eclosión de una larva planctónica libre. Las masas ovígeras contenían gran número de huevos conectados entre sí por un fino hilo de la cápsula ovígera. El desarrollo se observó sincrónico entre los embriones de una misma puesta y cada cápsula ovígera contenía en general un embrión. Los primeros estadios embrionarios luego de segmentaciones en espiral dan lugar a una larva trocófora y posteriormente a una veliger planctotrófica. El periodo de desarrollo del embrión hasta la eclosión de la larva se observó más breve a mayor temperatura, siendo así la temperatura un factor ambiental que modularía los tiempos del desarrollo embrionario y larval. La población de *S. lessonii* estudiada presentó características de su biología reproductiva comunes con otras especies de sifonáridos de zonas templadas y plasticidad relacionada a la temperatura en el desarrollo en los estadios tempranos de vida.

**Palabras clave:** gasterópodo pulmonado, intermareal, biología reproductiva, hermafroditismo simultáneo, desarrollo embrionario y larval, histología.

# Reproductive biology, embryonic and larval development of *Siphonaria lessonii* (Blainville, 1824) in the coast of the Buenos Aires province

## Abstract

Along the intertidal zone of Buenos Aires, the false limpet *Siphonaria lessonii* is the only pulmonate gastropod species and the dominant herbivore in the supra and midlittoral zone. The presence of artificial structures at the coastline, such as the Villa Gesell fishing pier, provides a new substrate for the colonization and development of *S. lessonii*, modifying its distribution as well as the ecological structure of the benthic community. The present work provides information on the reproductive biology of this species for which the reproductive system, the ultrastructure of the sperm, the reproductive cycle, the size of first sexual maturity and the embryonic and larval development are described. The reproductive system of *S. lessonii* was histologically examined and spermatozoa was characterized as having a conical acrosome with an elongated nucleus which is connected directly to the final piece through the middle piece surrounded by glycogen. The gametogenic characterization indicated simultaneous presence of female and male gametes in adult individuals throughout the two years studied and indicated spawning periods from the austral winter months to the end of the summer with an increase between the months of October and February. Size of first sexual maturity was determined at 7.60 mm for the male portion of the hermaphroditic gonad while 8.00 mm was registered for the female portion, indicating *S. lessonii* as a simultaneous protandric hermaphrodite. Egg laying and embryonic and larval development were described at two temperature ranges. Development is indirect resulting in the hatching of a free planktonic larva. The egg masses contained large numbers of embryos connected to each other by a fine thread of the egg capsule. Development was observed predominantly synchronous between embryos from the same clutch and each egg capsule generally contained a single embryo. The first embryonic stages after spiral cleavage give rise to a trochophore larva and later to a planktotrophic veliger. The period of the embryos development until hatching was observed briefer at higher temperature, thereby being temperature an environmental factor that would modulate the length of embryonic and larval development. *S. lessonii* population studied presented common characteristics of its reproductive biology to other

siphonariid species from temperate zones and plasticity related to temperature during early life stages development.

**Key words:** pulmonate gastropod, reproductive system, reproductive biology, simultaneous hermaphroditism, embryonic and larval development, histology.

## Agradecimientos

Antes que nada, me gustaría hacer un agradecimiento general a todas las personas que me acompañaron en el camino doctoral durante estos años.

Quiero agradecer a la educación pública y gratuita Argentina que me permitió el acceso a una formación de doctorado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Gracias al financiamiento de los que participé, de UBA, CONICET y Agencia de Promoción Científica y Tecnológica PICT dirigidos por la Dra. Juliana Giménez

Al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental y al Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada para desarrollar esta tesis doctoral.

A la secretaria de doctorado y la subcomisión de doctorado.

A la Dra. Juliana Giménez, mi especial agradecimiento por confiar en mí, por su calidez como persona, por guiarme con sus consejos y correcciones, por las charlas amenas, por los comentarios que me ayudaron a mejorar este trabajo y por brindarme la posibilidad de trabajar en su laboratorio y realizar el doctorado.

A mis compañeros de laboratorio que siguen y aquellos que pasaron, Euge, Celes, Alex, Ari, Vicky, Paula, Samuel, Camila, los mates, los viajes de muestreo, el aguante, las ideas y la ayuda fueron imprescindibles.

A la Dra. Laura López Greco que además de excelente consejera de estudio, siempre con la palabra cierta en el momento adecuado.

A la Dra. Graciela Esnal por su amabilidad en el trato y en los consejos.

A Jimena Dindurra por la atención en la asistencia los trámites necesarios para la presentación de este manuscrito.

A Fabián Tricarico y Mariela Romanelli del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" por la asistencia en Microscopía Electrónica de Barrido.

A mi familia, Paul, Marga, Cacá, Piu y Isolde, por todo y siempre. Son mi refugio.

A mis amigos por el compañerismo, los momentos fraternales y las risas sinvergüenzas. Un escape inestimable.

A Vicky, Julio y Rosella, por la generosidad de hacerme espacio cuando lo necesité. Gracias, gente querida!

Y a mi gran compañera de la vida, Mariel, mi agradecimiento más entrañable. Sin vos no habría llegado hasta este momento. ¡Todo mi amor para ti y nuestra pequeñita! Las adoro con todo mi corazón.

El océano es más antiguo que las montañas y está cargado con los recuerdos y los sueños del tiempo."

H.P. Lovecraft

**Resultados de esta tesis fueron publicados y presentados en congresos nacionales e internacionales:**

Parte de los resultados de capítulo 1 y totalidad del capítulo 2:

Knack de Almeida, H. y Giménez, J. 2018 Gonad characterization and reproductive seasonality in *Siphonaria lessonii* (Gastropoda: Heterobranchia) from the Southwestern Atlantic Ocean. *Invertebrate Biology*, 137: 264-277. <https://doi.org/10.1111/ivb.12225>

**Presentaciones a Congresos:**

Knack de Almeida, H. y Giménez, J. 2018. Talla de primera madurez sexual en *Siphonaria lessonii* (Gastropoda: Heterobranchia) en Villa Gesell, provincia de Buenos Aires. X Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Ciudad autónoma de Buenos Aires. Argentina.

Knack de Almeida, H. y Giménez, J. 2015. Reproductive aspects of *Siphonaria lessonii* (Gastropoda: Heterobranchia) from the South-western Atlantic Ocean American Malacological Society. Michigan. Estados Unidos.

# ÍNDICE

Introducción General	1
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Objetivos e Hipótesis</b>	5
<b>Objetivo general</b>	5
<b>Objetivos específicos</b>	5
<b>3. Área de estudio</b>	7
CAPÍTULO 1: Aparato Reproductivo	10
<b>1.1. Introducción</b>	10
<b>1.2. Materiales y Métodos</b>	12
<b>1.2.1. Histología del aparato reproductor</b>	12
<b>1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)</b>	12
<b>1.3. Resultados</b>	13
<b>1.3.1. Descripción general del aparato reproductor</b>	13
<b>1.3.2. Estructura y desarrollo de la gónada hermafrodita</b>	14
<b>1.3.3. Espermatogénesis y morfología del espermatozoide</b>	15
<b>1.4. Discusión</b>	17
Capítulo 2: Ciclo reproductivo	20
<b>2.1. Introducción</b>	20
<b>2.2. Materiales y métodos</b>	21
<b>2.2.1. Recolección de muestras e histología</b>	21
<b>2.2.2. Desarrollo de la gónada hermafrodita y ciclo gametogénico</b>	22
<b>2.2.3. Clasificación de estadios oocitarios</b>	22
<b>2.2.4. Variables ambientales</b>	22
<b>2.2.5. Análisis estadístico</b>	23
<b>2.3. Resultados</b>	23
<b>2.3.1. Estructura y desarrollo de la gónada hermafrodita</b>	23
<b>2.3.2. Reproducción estacional</b>	27
<b>2.3.3. Talla y distribución de los oocitos en los estadios gonadales</b>	28
<b>2.3.4. Talla y frecuencia de los estadios de oocitos</b>	32
<b>2.3.5. Variables ambientales y reproducción</b>	34
<b>2.4. Discusión</b>	34
Capítulo 3: Madurez sexual	41
<b>3.1. Introducción</b>	41
<b>3.2. Materiales y Métodos</b>	43
<b>3.2.1. Recolección de muestras e histología</b>	43

<b>3.2.2. Intervalos de talla de madurez sexual</b>	43
<b>3.3. Resultados</b>	43
<b>3.3.1. Talla de primera madurez sexual</b>	45
<b>3.4. Discusión</b>	46
Capítulo 4: Desarrollo embrionario y larval	48
<b>4.1. Introducción</b>	48
<b>4.2. Materiales y Métodos</b>	51
<b>4.2.1. Recolección y mantenimiento en acuario</b>	51
<b>4.2.2. Desove de masas ovíferas</b>	51
<b>4.2.3. Desarrollo embrionario y larval</b>	52
<b>4.2.4. Análisis estadístico</b>	53
<b>4.2.5. Morfología de la protoconcha</b>	54
<b>4.3. Resultados</b>	54
<b>4.3.1. Desove y masa ovígera in vitro</b>	54
<b>4.3.2. Desarrollo embrionario y larval</b>	56
<b>4.3.3 Caracterización ontogénica y morfológica del desarrollo embrionario y larval</b>	60
<b>4.3.4. Organogénesis en larva veliger</b>	66
<b>4.3.5. Morfología de la protoconcha</b>	68
<b>4.4. Discusión</b>	70
Conclusiones Generales	81
Bibliografía	85



# Introducción General

## Introducción

Los moluscos constituyen el segundo grupo en diversidad de especies conocidas actualmente en el reino animal sólo siendo superados por los insectos y los nematodos (Hyman, 1967; Ruppert y Barnes, 1994; Saleuddin, 1998; Baqueiro- Cárdenas et al., 2007) aunque en el ambiente marino, son el filo dominante (Giese y Pearse, 1977). Los gasterópodos son la clase más representativa del filo Molusca con un estimativo de entre 35.000 y 120.000 especies existentes (Ponder et al., 2002), siendo de estas, alrededor de 32.000 especies marinas (Appeltans et al., 2012), y presentando una gran diversidad morfológica y ecológica (Ponder y Lindberg, 1997; Dinapoli y Klussmann-Kolb, 2010). Tradicionalmente a la diversidad de los gasterópodos se los clasificaba en tres subclases principales: Prosobranchia, Opisthobranchia y Pulmonata, y aunque esta clasificación se ha modificado y ampliado a Caenogastropoda, Heterobranchia, Neomphaliones, Neritimorpha, Patellogastropoda y Vetigastropoda (Bouchet y Rocroi, 2005) las relaciones filogenéticas todavía están en debate (ejemplo, Jörger et al., 2010) sin embargo, actualmente terminología como pulmonata u opisthobranquios se utilizan de forma descriptiva (Nakadera y Koene, 2013).

La diversidad morfológica de los gasterópodos se refleja en sus diversos modos de reproducción (Giese y Pearse, 1974). Además, la estrategia reproductiva de un organismo ejerce un papel fundamental en la dinámica poblacional de la especie, así como en su distribución geográfica y en su supervivencia. Los patrones en los ciclos reproductivos de los invertebrados marinos son altamente variables y están vinculados a factores exógenos y endógenos, y probablemente la sincronización entre ambos regule tal proceso (Giese y Pearse, 1974). Factores ambientales como por ejemplo la disponibilidad de alimento, la temperatura y el fotoperiodo pueden influir directamente en el desarrollo y maduración de la gónada (Mendes y Woodley, 2002). A su vez, el desove, el desarrollo y asentamiento de las larvas, en particular aquellas que deben adquirir alimento para su desarrollo (planctotróficas) pueden estar influenciados por estos factores, además de la amplitud de marea y las fases lunares (Wourms, 1987; Currie et al., 2000).

En los gasterópodos, el hermafroditismo es una modalidad ampliamente representada que incluye especies que habitan ambientes marinos, estuarinos, de agua dulce y terrestre, lo que sugiere que esta característica reproductiva primitiva, no

corresponde a una respuesta adaptativa sino una restricción filogenética (Heller, 1993). Las estrategias reproductivas de los hermafroditas son diversas y entre ellas existen los hermafroditas simultáneos representa un costo energético reproductivo que corresponde a la inversión en la producción de ambos gametos sincrónicamente (Heath, 1977). Sin embargo, teóricamente esta modalidad reproductiva sería ventajosa ante la reducida capacidad móvil entre los gasterópodos al momento de encontrar otro individuo para la cópula. Además del hermafroditismo, distintas especies de gasterópodos muestran otras características reproductivas primitivas, como la dependencia por el agua para reproducirse, que, asociadas a características como poseer genitales con dos conductos gonadales separados para evitar la autofecundación - una característica que confiere ventajas selectivas a estos animales - hace de este uno de los grupos de moluscos más exitosos actualmente (Morton, 1955a, b).

Los gasterópodos marinos en su mayoría presentan un complejo ciclo de vida que comprende dos estadios de vida libre, posteriores a la conclusión del desarrollo embrionario. La ontogenia en esos organismos produce un primer estadio de forma larval pelágico sucedido, mediante un proceso metamórfico, de un segundo estadio juvenil-adulto bentónico (Degnan y Degnan, 2006; Page, 2009). Durante el desarrollo embrionario los sucesivos clivajes celulares definen los tiempos del desarrollo, las relaciones entre volúmenes celulares y los distintos patrones de espiralización (Verdonk y van den Biggelaar, 1983; van den Biggelaar, 1993). Esos patrones son altamente conservados entre taxones (Dictus y Damen, 1997; Henry et al., 2007) y proporcionan un marco para los subsiguientes estadios del desarrollo (Verdonk y van den Biggelaar, 1983).

La etapa de larva pelágica en una especie puede durar días, semanas o incluso meses en el plancton antes de que las larvas puedan metamorfosearse en juveniles bentónicos (Young, 2002). Durante ese tiempo la larva se diferencia morfológica y ecológicamente, a las formas juvenil y adulta, y su desarrollo corresponde un componente importante de la estrategia de vida de una especie (Hickman, 1999).

En los gasterópodos, la subclase Heterobranchia (Haszprunar, 1985b), que como el propio nombre indica, reúne taxones con una diversidad de estructuras branquiales que incluye a Opisthobranchia, Pulmonata y Allogastropoda o Heterobranchia Inferior (Haszprunar, 1985a; Ponder y Lindberg, 1997; Dinapoli y Klussmann-Kolb, 2010). La diversidad de estructuras branquiales les permitió la colonización de nuevos ambientes acuáticos y terrestres y como resultado, comprende uno de los grupos más ricos en especies y morfológicamente más diversos dentro los Gastropoda (Haszprunar, 1985a;

Dinapoli y Klussmann-Kolb, 2010). Entre los pulmonados la familia Siphonariidae posee una característica distintiva: la presencia de una branquia secundaria (Hubendick, 1947; Yonge, 1952; Morton, 1955b; Solem, 1985), pseudobranquia (McAlister, 1967; Di Giorgio et al., 2014) o branquia cefalaspideana (Marcus y Marcus, 1960) en la cavidad del manto. Esta característica les permite respirar aeróbicamente tanto el oxígeno atmosférico, como el oxígeno presente en el medio acuático (Innes et al., 1984; Hodgson, 1999) posibilitando que colonicen y coexistan con otros moluscos marinos del intermareal (Chambers y McQuaid, 1994b). La presencia de este carácter ha generado, en función de su morfología, una discusión en torno a la ancestralidad de la familia, habiendo estudios (De Villiers y Hodgson, 1987) que indican que esta particularidad estaría emparentada originalmente al grupo de los opistobranquios antes que a los pulmonados mientras otros autores (Hubendick, 1947; Borland, 1950; Younge, 1952) lo asocian a un ancestro terrestre. Asimismo, la presencia de un estadio larval planctotrófico ha llevado algunos autores (Hyman, 1967; Purchon, 1979) a convenir en un origen marino para esta familia, ubicándolos dentro de Euthyneura, en donde se incluyen a los opistobranquios y pulmonados. En la costa del Atlántico sudoccidental, Olivier y Penchaszadeh (1968) sugieren que los sifonáridos pudieron tener un ancestro antártico debido a su origen geográfico de distribución.

*Siphonaria lessonii* (Blainville, 1827) (Figura 1.1) de la familia Siphonariidae es una especie endémica del sur de América del Sur, (Dayrat, et al., 2014; Güller, et al., 2016). Los integrantes de dicha familia son comúnmente encontrados habitando una diversidad de sustratos del intermareal principalmente en zonas tropicales y templadas alrededor del mundo (Hodgson, 1999). *S. lessonii* posee amplia distribución, con registros que asignan la especie en el Océano Atlántico desde Santa Catarina, Brasil, hasta el extremo sur del continente, incluyendo Islas Malvinas y el Estrecho de Magallanes hasta Cabo de Hornos; y siguiendo por el Pacífico hacia el norte hasta Paita en la costa de Perú (Rios, 2009; Nuñez et al., 2015; Güller et al., 2016). *S. lessonii* es una especie euritérmica y eurihalina, que vive adherida al sustrato rocoso de la zona litoral medio y superior donde está sometida a condiciones ambientales variables como temperatura, exposición a mareas y vientos (Olivier y Penchaszadeh, 1968).

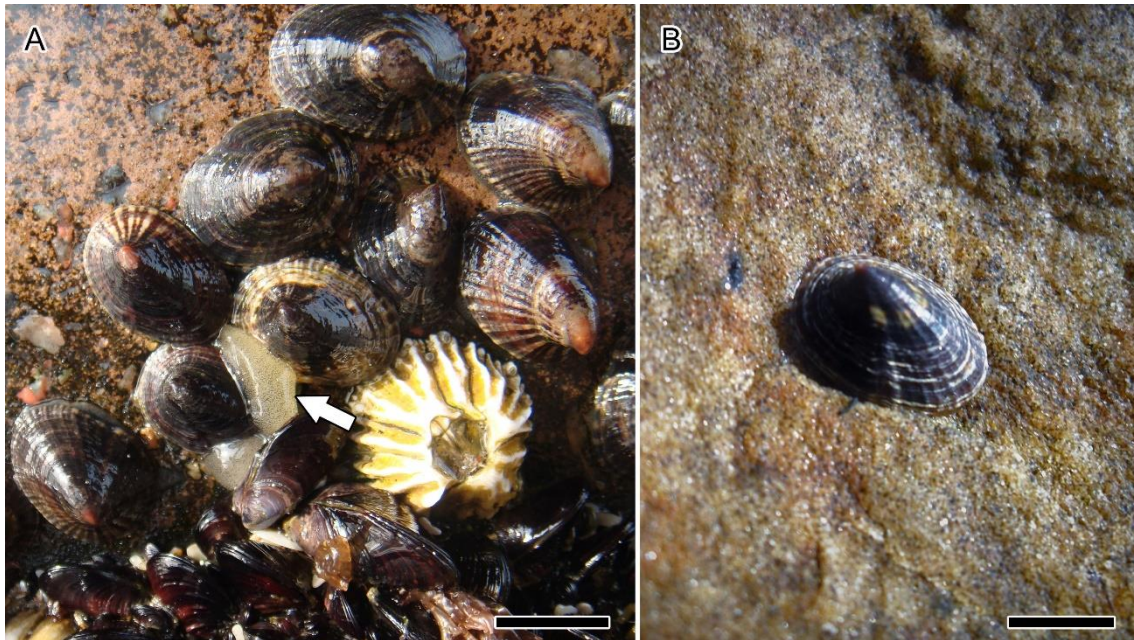


Figura 1.1. Presencia de *Siphonaria lessonii* en el muelle de Villa Gesell. **A.** En la zona del mediolitoral superior, cercano al margen superior comunidades de mejillines (*Brachidontes rodriguezii* y *Mytilus platensis*), durante baja marea donde pastorea; **B.** En zona del supralitoral inferior en periodo de alta marea.

*S. lessonii* es la única especie de gasterópodo pulmonado y el herbívoro dominante en la zona intermareal a lo largo de la costa de la provincia de Buenos Aires (Tablado et al., 1994). Los estudios sobre esta especie se centran en su ecología y su papel como herbívoro dominante en sedimentos consolidados de la costa bonaerense (Adami, 2008; Nuñez et al., 2014; Olivier y Penchaszadeh, 1968). Su dieta consiste principalmente en algas diatomeas, clorofitas y rodofitas (Bastida et al., 1971), y su actividad herbívora regularía compitiendo por el espacio con las poblaciones del mitúlido *Brachidontes rodriguezii*, en los niveles medio y bajo del intermareal (Adami, 2008). A su vez, la especie *S. lessonii* se la ha propuesto como organismo bioindicador y se han desarrollado estudios cuantificando la acumulación de bifenilos policlorados (PCB) en tejidos blandos (Laitano et al., 2016), la respuesta bioquímica a la contaminación crónica en una zona portuaria (Laitano y Fernández-Giménez, 2016), alteraciones histológicas en la glándula digestiva (Landro et al., 2021) y modificaciones en la morfología de la concha en sitios con diferente grado de actividades antrópicas de la costa bonaerense (Tablado y López Gappa, 2001; Nuñez et al., 2012, Landro et al., 2021). Además, varios estudios continúan las descripciones de la anatomía y morfología de *S. Lessonii* dada su amplia distribución a lo largo de la costa argentina y de su importancia ecológica (Olivier y Penchaszadeh, 1968; Di Giorgio et al., 2014; Güller et al., 2016; Landro et al., 2019).

## Objetivos e Hipótesis

### Objetivo general

Estudiar y caracterizar aspectos relacionados a la reproducción, la maduración sexual y el desarrollo de los estadios tempranos de vida de *Siphonaria lessonii* (Blainville, 1827), y evaluar la influencia de la temperatura en el desarrollo larval.

Hipótesis general: *Siphonaria lessonii* presenta características reproductivas comunes a otros sifonáridos y estacionalidad en su ciclo reproductivo. La talla de primera madurez sexual indica un periodo de protandria previo a la presencia simultánea de ambos gametos maduros. Su desarrollo embrionario y larval presenta plasticidad ante diferentes temperaturas.

Para llevar a cabo este objetivo general, la presente tesis se organiza en los siguientes capítulos:

### Objetivos e hipótesis específicas

**Capítulo 1.** Caracterización morfológica del sistema reproductivo y ultraestructura del espermatozoide.

Objetivo 1.1) Caracterizar la estructura del aparato reproductor de *S. lessonii*.

Hipótesis 1.1: El aparato reproductor corresponde estructuralmente a descripciones de su familia, aunque con particularidades morfológicas.

Objetivo 1.2) Caracterizar la ultraestructura del espermatozoide

Hipótesis 1.2: La ultraestructura del espermatozoide en *S. lessonii* es característica de los sifonáridos.

**Capítulo 2.** Ciclo reproductivo.

Objetivo 2.1) Estudiar el desarrollo gametogénico y la sincronía en la maduración para las células sexuales (oocitos y espermatozoides).

Hipótesis 2.1: existe sincronía en el desarrollo gamético y en la maduración de las células sexuales en la gónada hermafrodita de *S. lessonii*.

Objetivo 2.2) Caracterizar y determinar la estacionalidad del ciclo reproductivo en la población de *S. lessonii* presente en el muelle de Villa Gesell.

Hipótesis 2.2: El ciclo reproductivo de *S. lessonii*, como en otras especies intermareales de zonas templadas, presenta estacionalidad en su desarrollo gametogénico y desove en estaciones de primavera y verano.

Objetivo 2.3) Examinar la relación entre el ciclo reproductivo y los factores ambientales vigentes en el sitio de muestreo.

Hipótesis 2.3: existe una relación entre el ciclo reproductivo y los factores ambientales (fotoperiodo, temperaturas atmosférica y de superficie del mar).

### **Capítulo 3.** Talla de primera madurez sexual.

Objetivo 3.1) Establecer las tallas de primera madurez sexual para las porciones femenina y masculina de la gónada hermafrodita de *S. lessonii*.

Hipótesis 3.1: *S. lessonii* presenta primera madurez sexual gonadal a diferentes tallas.

Objetivo 3.2) Determinar el tipo de hermafroditismo en la estrategia reproductiva de *S. lessonii*

Hipótesis 3.2: Existe una diferencia en los tiempos de maduración para las porciones femenina y masculina de la gónada resultando en un hermafroditismo protándrico simultáneo.

### **Capítulo 4.** Desarrollo embrionario y larval.

Objetivo 4.1) Describir morfológicamente los estadios del desarrollo embrionario y larval de *Siphonaria lessonii* de individuos de la población de Villa Gesell.

Hipótesis 4.1: Los estadios de desarrollo embrionario y larval de *S. lessonii* presentan características morfológicas semejantes con otros sifonáridos.

Objetivo 4.2) Determinar los tiempos del desarrollo embrionario y larval en dos rangos de temperatura.

Hipótesis 4.2: La temperatura modula el tiempo del desarrollo embrionario y larval en *S. lessonii*.

Objetivo 4.3) Investigar variaciones en el crecimiento y desarrollo embrionario, larval y ovicápsulas en dos rangos de temperatura;

Hipótesis 4.3: Existe una relación en el crecimiento embrionario, larval y de las ovicápsulas relacionado a la temperatura.

Objetivo 4.4) Caracterizar la morfología de la protoconcha en el desarrollo de la larva veliger en *S. lessonii*.

Hipótesis 4.5: la morfología de la protoconcha de la larva veliger presenta indicios evolutivos de la especie.

## Área de estudio

Los muestreos fueron realizados mensualmente en la población de *S. lessonii* presente en el muelle de Villa Gesell (37°16'S 56°58'O), provincia de Buenos Aires (Figura 1.2) entre los años de 2012 y 2016.

La localidad de Villa Gesell se ha construido sobre una barrera medanosa geológicamente joven ( $\pm$  1400 años) ubicada en el borde oriental de la subregión de la Pampa Húmeda, con una disposición transversal a la línea de costa (Isla et al., 1998; Bértola et al, 2002). Esta zona representa geomorfológicamente una planicie costera, caracterizada por un relieve extremadamente llano y bajo, con playas (supra y mesolitoral) constituidas por arena mediana a fina (Marcomini y López, 1997) y que se encuentran expuestas a la acción del oleaje que incide principalmente de sur y sureste, dando origen a una corriente de deriva litoral con dirección noreste (Marcomini y López, 1997). La amplitud media de marea en Villa Gesell es de 0,82 m con un régimen micromareal de tipo semidiurno (Marcomini y López, 2006). Las tormentas extraordinarias impactan en el nivel del mar, provocando ascensos de hasta 1,5 m sobre el nivel de marea esperado. Dichas tormentas influyen considerablemente sobre la hidrodinámica de la playa presentando mayor frecuencia en verano aunque sin una periodicidad destacada (Marcomini y López, 2006). La temperatura superficial del mar en la costa de Villa Gesell presenta un valor medio más alto en el mes de febrero con 21.9°C, mínima de 19.9°C y máxima de 25°C, mientras que en agosto alcanza su media más baja anual con 10.2°C, y valores de mínima de 8°C y máxima de 12.4°C (<http://seatemperature.info>).

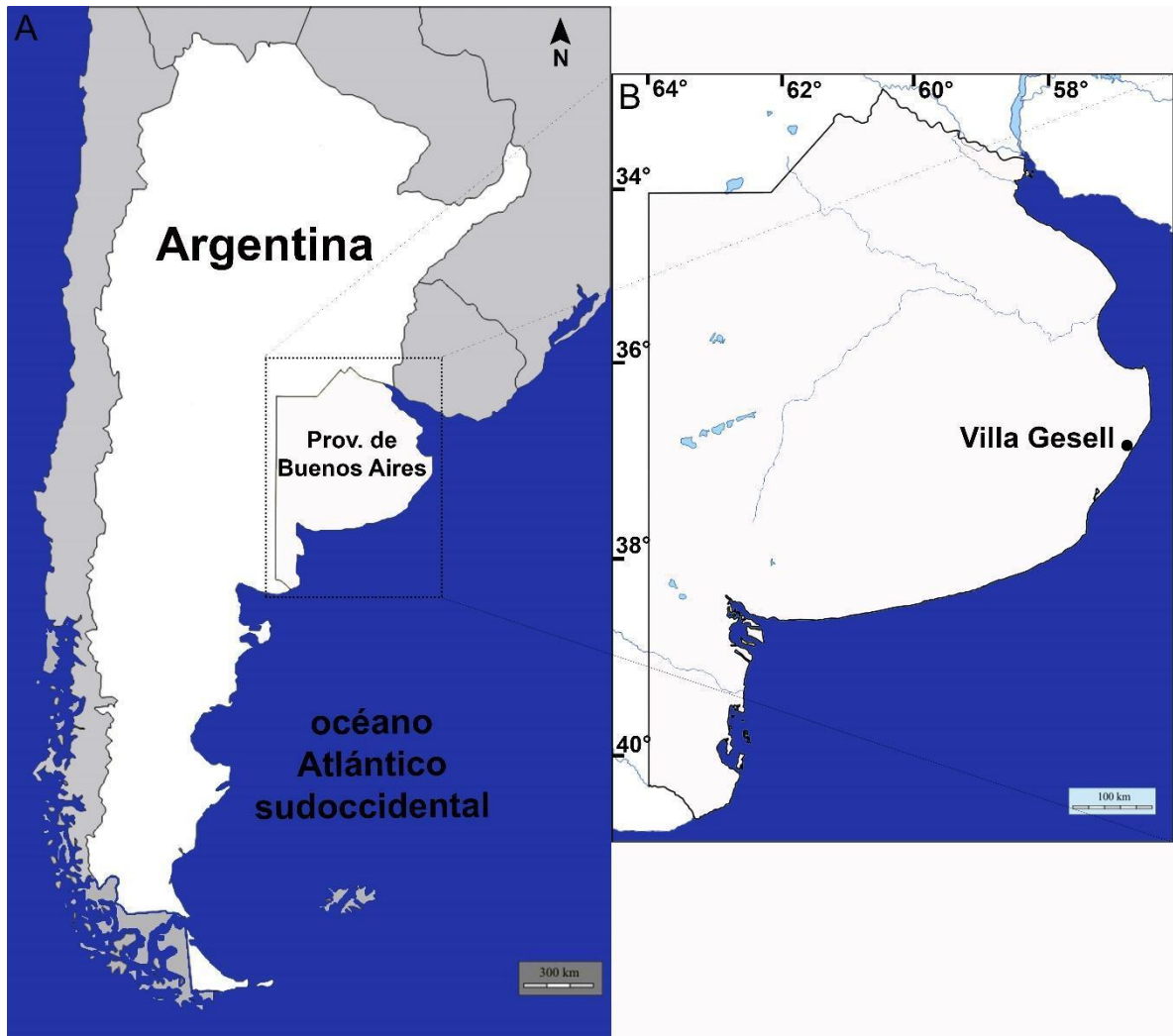


Figura 1.2. Área de estudio. **A.** Provincia de Buenos Aires en Argentina. **B.** Sitio de muestreo ubicado en la localidad de Villa Gesell.

Villa Gesell presenta moderado desarrollo urbanístico y escaso disturbio antrópico (Arrighetti et al., 2019; Torroglosa y Giménez, 2019). Cuenta con un muelle de pescadores construido en hormigón armado, de 8 metros de alto, 6 metros de ancho el cual ingresa 150 metros sobre el mar con un morro de 15 metros de largo y 5 metros de ancho en su extremo (Figura 1.3A). Las estructuras artificiales como los muelles utilizados para la pesca recreativa, introducidos en playas arenosas, como es el caso de Villa Gesell, proporcionan nuevos sustratos para la colonización y el desarrollo de *S. lessonii*, lo que influye no solo en la distribución geográfica de esta especie sino también en la estructura ecológica de la comunidad bentónica en estos sustratos (Figura 1.3B).



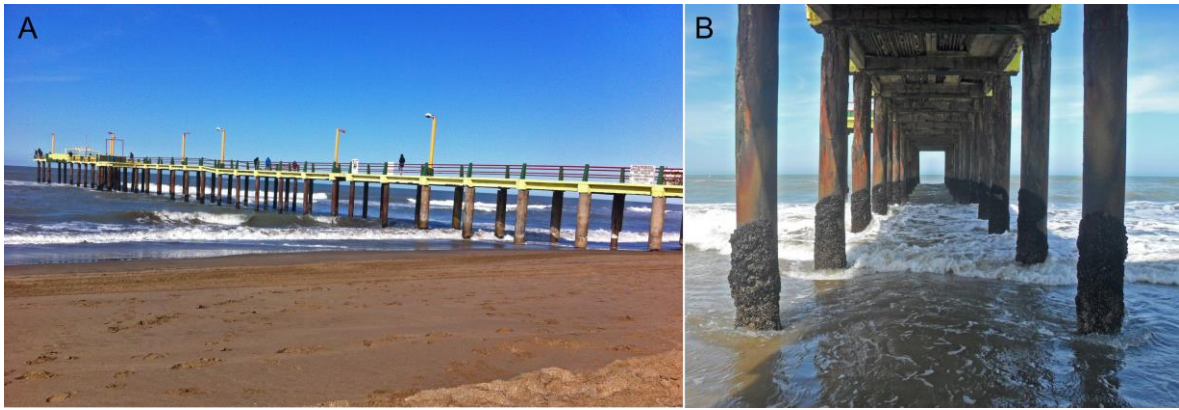


Figura 1.3. **A.** Muelle de pescadores de Villa Gesell vista norte. **B.** Disposición de la comunidad de mejillinar en los pilotes del muelle donde también habita *Siphonaria lessonii*.

# CAPÍTULO 1: Aparato Reproductivo

## 1.1. Introducción

El éxito evolutivo y adaptativo de los gasterópodos en habitar nichos ecológicos terrestres y acuáticos, se ve reflejado en la gran diversidad de especies y por consecuencia en una gran variedad de características reproductivas. Entre ellas, la expresión sexual en forma gonocórica o hermafrodita (simultáneo o secuencial), con fecundación cruzada o auto fecundación, fecundación interna y externa, organismos ovíparos o ovivíparos, con o sin cuidado parental y diversidad de estrategias de apareamiento. En ese sentido, la supervivencia y dispersión de una especie están directamente relacionadas a las adaptaciones reproductivas que permiten efectivamente la transferencia de material genético (Anderson et al., 1976). Por lo tanto, el aparato reproductivo cumple un papel fundamental como fuente de información para los análisis sistemáticos y filogenéticos, especialmente en los heterobránquios, el grupo más heterogéneo entre los gasterópodos (Simone y Seabra, 2017).

En Heterobranchia, los pulmonados son un taxón exclusivamente de organismos hermafroditas predominantemente representados por gasterópodos terrestres pero que incluye un selecto grupo de especies marinas (Berry, 1977). En función de esta condición sexual, algunas especies disponen de órganos reproductivos más complejos en comparación con los demás grupos como por ejemplo, presencia de espermateca (órgano de almacenamiento de aloesperma), órgano digestivo de esperma, saco de dardos espermáticos, apéndice peneal, entre otros (Berry, 1977). Si bien la producción concurrente de ambos gametos sexuales puede considerarse una ventaja para organismos de baja movilidad o de bajas densidades (Ghiselin, 1969, 1987), también requiere, durante la cópula, de una eficiente separación entre los espermatozoides exógenos y endógenos, y de estos con los óvulos (Gómez, 2001). Esta separación en los pulmonados se evidencia en la diferenciación de tres sistemas de conductos genitales: monáulicos (conducto genital común para ambos gametos), diáulicos sintremicos (conductos separados que convergen en una única abertura genital), y diáulicos diatremicos (dos conductos genitales que se abren a través de aberturas separadas), en los que las diferencias morfológicas entre los tres finalmente determinan la estrategia de apareamiento de la especie (Golding et al.,

2008). Los sifonáridos, por su parte, presentan sistemas monáulicos similares pero que anatómicamente exhiben algunas peculiaridades (Allanson, 1959; Marcus y Marcus, 1960; Jenkins, 1981, 1983, 1984; Simone y Seabra, 2017). Además, los sifonáridos son hermafroditas de tipo simultáneo, aunque Creese (1980) señala que podrían exhibir una forma de protandrismo (previa maduración del espermatozoide) anterior a la simultaneidad.

En especies de *Siphonaria* sp. se ha descrito el aparato reproductor constituido por una gónada hermafrodita u ovotestis ubicada en la porción posterior y formada por una serie de acinos, donde ambos gametos se desarrollan simultáneamente (Hodgson, 1999). La gónada está conectada al ducto hermafrodita que desemboca en el espermoviducto, anterior a la vesícula seminal. En su porción anterior, el ducto hermafrodita se encuentra asociado, por un conducto, a la glándula del albumen. El espermoviducto se acopla al órgano accesorio que a su vez presenta una apertura genital en el lado derecho. También están conectados al órgano accesorio, la bursa copulatrix, el ducto del epifalo, que une la glándula del epifalo, y finalmente el órgano copulador masculino (Hodgson, 1999). Los sifonáridos poseen fecundación interna en la que el individuo donador de espermatozoide transfiere espermátóforos, una masa consistente de variada forma, secretada por la glándula del epifalo y que encierra una cantidad de espermatozoides (Mann, 1984; Berry, 1977). El espermatozoide en la familia Siphonariidae es una célula del tipo endosperma (Hodgson et al., 1991).

Estudios descriptivos de la morfología y ultraestructura del espermatozoide así como de aspectos de la espermatogénesis han aportado significativamente en la evaluación filogenética y taxonómica de los gasterópodos pulmonados, un taxón con relaciones aun irresolutas (Healy, 1983b; Hodgson y Bernard, 1988; Healy y Jamieson, 1989; Hodgson et al., 1991; Chen et al., 2015; Soldatenko y Shatrov, 2016). Schmera (2016) advierte, además, que la forma y la función de los espermatozoides están influenciadas por presiones evolutivas que, según modelos teóricos, seleccionarán la talla del espermatozoide a través de la competencia espermática y el ambiente de fecundación.

Los sifonáridos presentan una combinación de características ancestrales y derivadas, lo que los hace un grupo interesante de relaciones morfológicas y anatómicas en estudios evolutivos dentro de los Heterobranchia (Hubendick, 1947). De acuerdo con Dayrat et al. (2014) se estima que existen entre 41 y 100 especies del género *Siphonaria* actualmente distribuidos en ambientes costeros alrededor del globo (Hubendick, 1947), no obstante, algunas especies de sifonáridos todavía carecen de descripciones detalladas

de las características morfológicas y anatómicas. Por lo tanto, información al respecto, así como de la morfología del espermatozoide de *S. lessonii*, una especie con amplia presencia en ambas costas del cono sur de continente suramericano (Güller et al., 2016), puede ser clave para comprender varios aspectos de su biología reproductiva, y a partir de estos interpretar posibles adaptaciones de su ciclo de vida frente a los cambios ambientales.

## **1.2. Materiales y Métodos**

### **1.2.1. Histología del aparato reproductor**

Cinco especímenes adultos de *S. lessonii*, entre 12,00 y 14,00 mm de largo total de concha, colectados en el muelle de Villa Gesell fueron transportados vivos al Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos y relajados por inmersión durante 12 h en una solución de 7,5 % de MgCl<sub>2</sub> en agua de mar. Posteriormente, se diseccionó el aparato reproductivo bajo microscopio estereoscópico Leica MZ8 y se fotografiaron con la ayuda de una cámara digital Olympus VG-160.

Las gónadas fueron seccionadas y fijadas en solución acuosa de Bouin durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la fijación, los órganos fueron deshidratados en concentraciones ascendentes de etanol hasta 96° y posteriormente incluidos en historesina para ser seccionados a 5 µm de espesor usando un micrótopo Leica RM 2155. La coloración utilizada fue hematoxilina y eosina. Las secciones fueron observadas con un microscopio óptico (Zeiss Axiostar) y se registraron fotográficamente con una cámara Canon (Canon G10).

### **1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las descripciones de la espermatogénesis y de la morfología del espermatozoide fueron realizadas a través de observaciones en microscopía electrónica de transmisión (MET). Para ello porciones de las gónadas fueron fijadas en glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4 y agua de mar durante 12 h a 4°C y luego lavadas reiteradamente en solución de buffer fosfato. La post fijación de las muestras se realizó en tetróxido de osmio 1% en buffer durante 2 h a temperatura ambiente y se deshidrataron gradualmente en etanol y acetona hasta 100° (1:1). Finalmente, fueron embebidas en una mezcla de resina y araldita. Los cortes semifinos de 1 µm de espesor fueron teñidos con azul de toluidina y observados con microscopio óptico. Los cortes ultrafinos se realizaron

en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica (LANAIS-MIE, UBA-CONICET) con ultramicrotomo Reichert y fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron examinadas, observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 300 y Jeol 1010. La morfometría de los gametos masculinos se hicieron con el software AxioVision (2013) 4.8.2., tomándose como medida el diámetro del eje mayor de cada célula.

## **1.3. Resultados**

### **1.3.1. Descripción general del aparato reproductor**

El aparato reproductivo de *S. lessonii* se observó ubicado en la porción dorsal de la región visceropalial, por sobre el pie y debajo de la cavidad del manto (órgano “pulmonar”) (Figura 1.1A). En la porción posterior se sitúa la gónada hermafrodita que se conecta antero-ventralmente al ducto hermafrodita, que a su vez, converge lateralmente en la glándula del albumen, en la región media derecha del organismo (Figura 1.1B, C). El ducto hermafrodita presenta una serie de inserciones en la base de la gónada hermafrodita que convergieron sobre un solo canal que al alejarse una corta distancia de la gónada, se observó una serie de plegamientos sobre su estructura. La porción distal del ducto hermafrodita, próximo a la glándula del albumen, se une desde el lado izquierdo al órgano recipiente de forma alargada, el receptáculo seminífero. En la región mediana palial, el espermoviducto se extiende desde la glándula del albumen recorriendo en curva inicialmente hacia el lado izquierdo hasta hallarse ya en la región anterior con la base del órgano accesorio, en el lado derecho. En la región distal del aparato reproductor, se encuentran desde la parte anterior, sobre la región de la cabeza, el epifalo que se conecta a la porción anterior del órgano accesorio a través del conducto epifálico (Figura 1.1C).

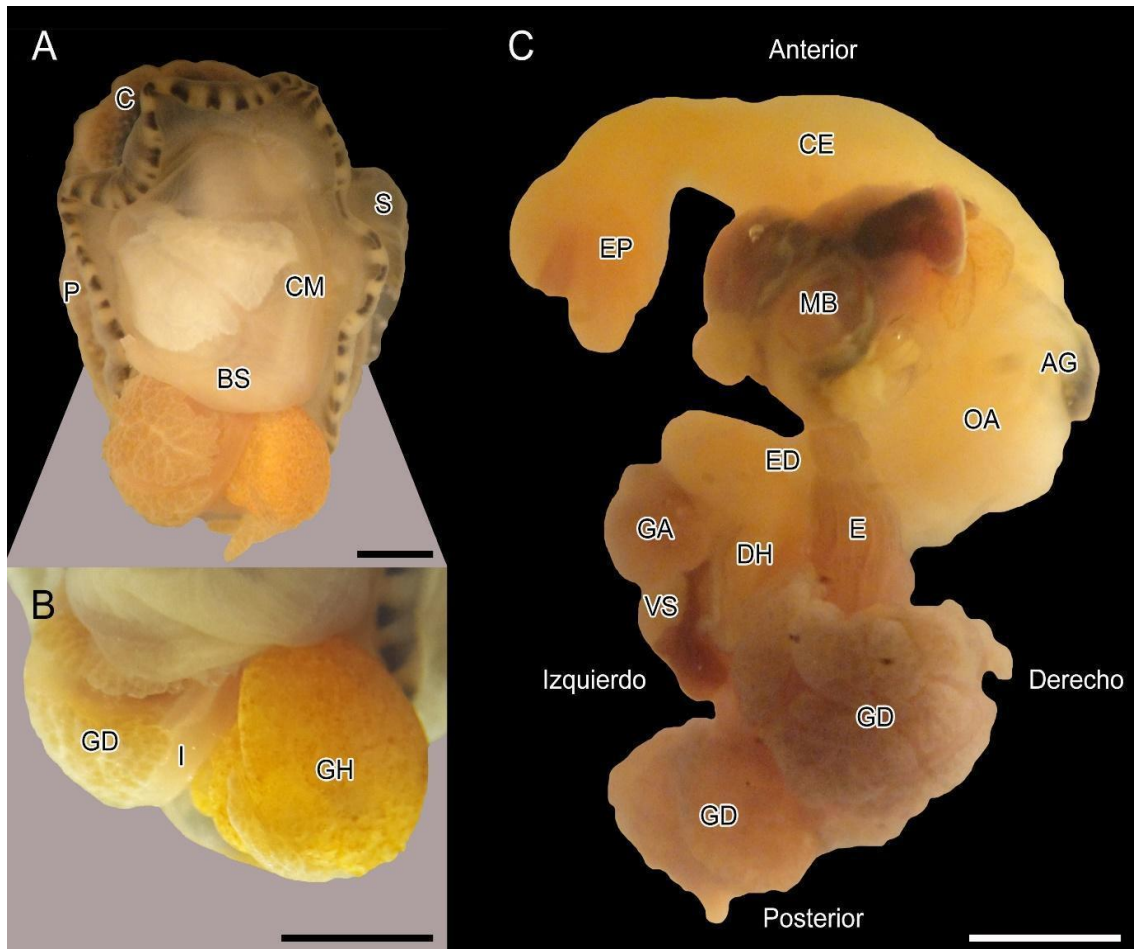


Figura 1.1. Generalidades del aparato reproductor de *S. lessonii*. **A.** Vista dorsal de individuo adulto luego de la extracción de la concha y del epitelio del manto; **B.** Detalle dorsal de la gónada hermafrodita a la derecha del lóbulo izquierdo de la glándula digestiva atravesada por parte del intestino; **C.** Vista ventral del aparato reproductor, eje antero-posterior y eje izquierdo-derecho. Abreviaturas: AG, apertura genital; BS, branquia secundaria; C, cabeza; CE, conducto epifalico; CM, cavidad del manto; DH, ducto hermafrodita; E, estómago; ED, espermoviducto; EP, epifalo; GA, glándula del albumen; GD, glándula digestiva; GH, gónada hermafrodita; I, intestino; MB, masa bucal; OA, órgano accesorio; P, pie; S, sifón; VS, vesícula seminal. Escalas: 0,2 cm.

### 1.3.2. Estructura y desarrollo de la gónada hermafrodita

La gónada hermafrodita (GH) de *S. lessonii* es un órgano multifolicular localizado en la parte dorsal posterior del cuerpo debajo del ápex de la concha, desde la parte media hacia el lado derecho del organismo y asociada a la glándula digestiva (Figura 1.2A). Posee un formato globular a irregular predominantemente de color amarillo anaranjado que puede variar de beige a naranja parduzco según su desarrollo. Los individuos maduros observados de *S. lessonii* presentaron simultáneamente tanto oocitos como espermatozoides dentro del mismo acino de la gónada. Las células masculinas se desarrollan más al centro de la gónada, cercanas al ducto hermafrodita, mientras que las



células femeninas se desarrollan periféricamente. El desarrollo de los gametos ocurre del borde hacia el centro en los acinos, con los oocitos creciendo y separándose gradualmente de la pared del acino y llenando la luz del acino (Figura 1.2B).

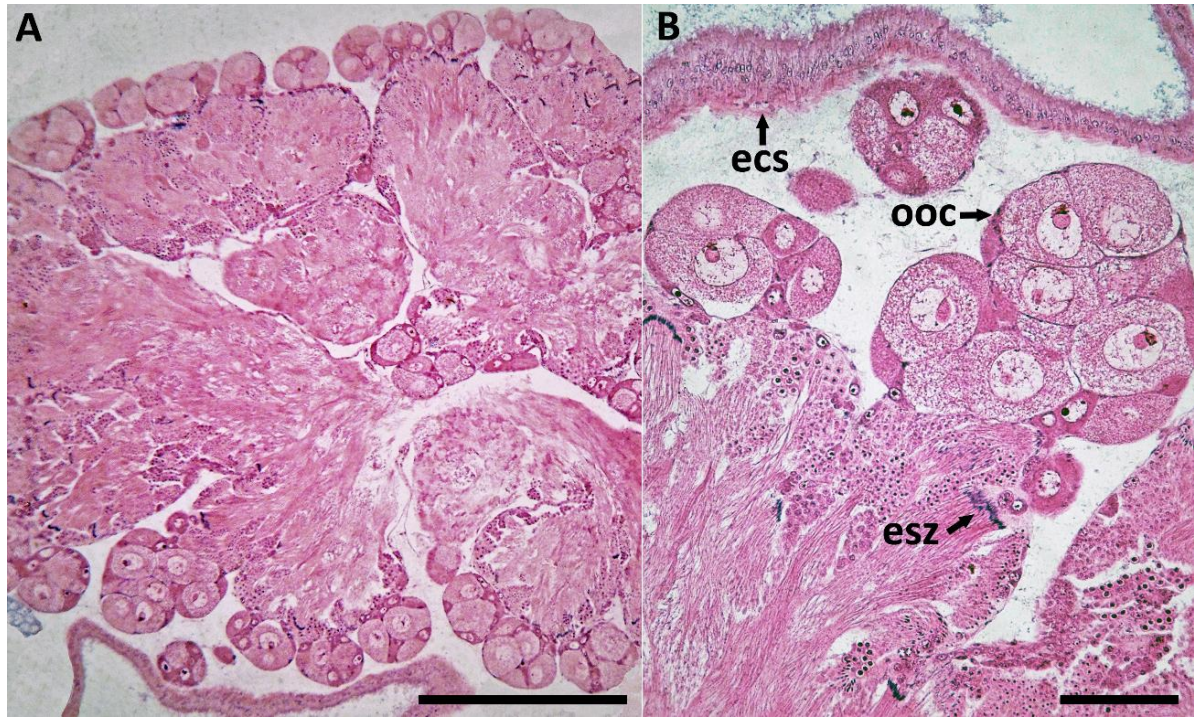


Figura 1.2. Corte transversal de la gónada hermafrodita de *S. lessonii*. **A.** Vista general que muestra la distribución periférica de los oocitos y de los espermatozoides en la región interna; **B.** Detalle del desarrollo de los oocitos en la región distal de los acinos en la gónada. Abreviaturas: ooc, oocito; ecs, epitelio conectivo simple; esz, espermatozoides. Escalas: A = 500  $\mu\text{m}$ ; B = 100  $\mu\text{m}$ .

### 1.3.3. Espermatogénesis y morfología del espermatozoide

En la espermatogénesis se observó un proceso progresivo de maduración de los gametos desde la pared interna del epitelio de los acinos hacia el lumen del mismo, y desde las porciones distales, hacia el interior de la región proximal del acino, cercanas al ducto hermafrodita (Figura 1.3A). Las espermatogonias se diferenciaron de las células germinales presentes en el epitelio del acino, presentaron una forma ovalada de entre 7~8  $\mu\text{m}$  de diámetro y agrupadas en asociación a las células del epitelio del acino. Los espermatocitos, originados de divisiones mitóticas, presentaron forma esférica (diámetro de 10~11  $\mu\text{m}$ ) y en algunos casos, fue posible advertir espermatocitos todavía unidos por el citoplasma, indicando la finalización del proceso de citocinesis de la primera división meiótica (Figura 1.3B). Luego de la segunda división meiótica, los espermatocitos

secundarios (diámetro de 8~9  $\mu\text{m}$ ) derivaron en espermatidas inmaduras todavía de forma ovalada y al completarse la condensación de la cromatina pudo observarse una incipiente elongación del núcleo. En esta modificación del núcleo, el par de centriolos se desplazó gradualmente hacia la base nuclear y se dio origen a los axonema (Figura 1.3C). En la maduración de la espermatida, al inicio de la espermiogénesis, se notó la presencia de una gran cantidad de vesículas alrededor del axonema en la pieza media. Se advirtieron espermatidas en grupos de distinta maduración localizadas centralmente en el lumen del acino (Figura 1.3D).

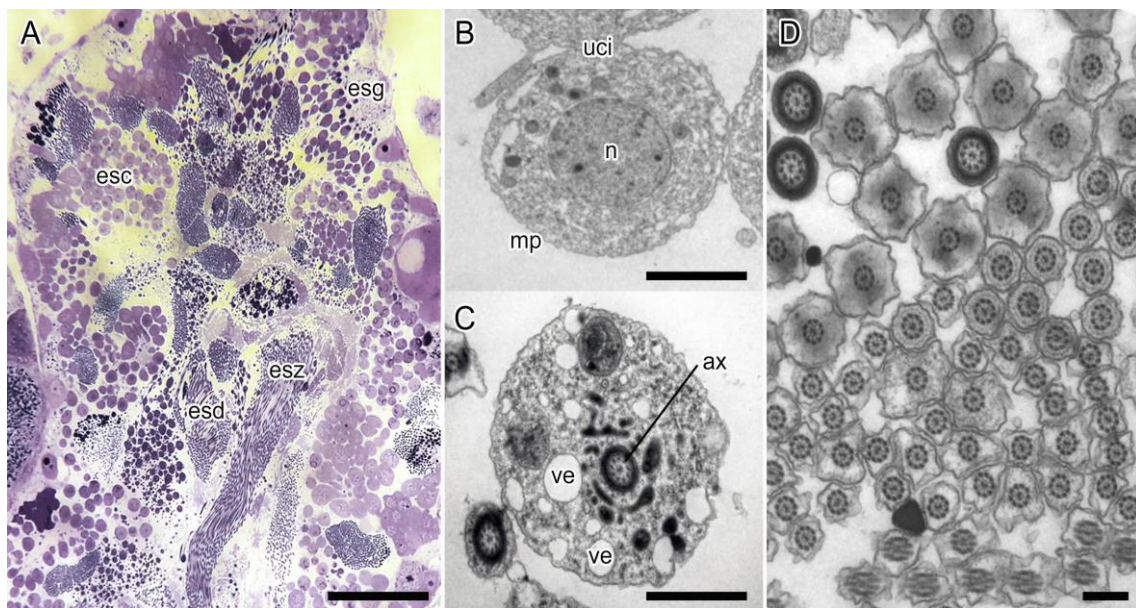


Figura 1.3. Espermatogénesis en *S. lessonii*. **A.** Acino con predominancia de células masculinas en distintas etapas de maduración; **B.** Detalle de espermatocito conectado a través del citoplasma a otros espermatocitos. **C.** Sección transversal (ST) de la pieza media proximal de una espermatida inmadura. **D.** Sección transversal (ST) espermatidas. Abreviaturas: ax, axonema; esc, espermatocito; esd, espermatida; esg, espermatogonia; esz, spermatozoide; mp, membrana plasmática; n, núcleo; uci, unión citoplasmática intercelular; ve, vesículas. Barra de escala: A, 100  $\mu\text{m}$ ; B, C, D: 5  $\mu\text{m}$ .

En el estadio tardío de la maduración de la espermatida (Figura 1.4A-B), ésta continuó su proceso de diferenciación, con elongación de la pieza media y del núcleo que incluso se observó más oscuro, probablemente consecuencia de la condensación del material nuclear.

El análisis morfológico del spermatozoide de *S. lessonii* indicó una estructura formada por un acrosoma cónico en su región apical que cubre el núcleo de perfil



alargado. El núcleo presentó en su porción distal una invaginación central en la que desde su base se observa la inserción de la pieza media que a su vez se continúa en el flagelo desde el núcleo (Figura 1.4C-E). El núcleo se observó invaginado posteriormente y este doblamiento alberga el aparato centriolar que origina el axonema (Figura 1.4F-G). Además del axonema (9 + 2), se advirtió que desde el centriolo emergen nueve fibras gruesas (fg) con bandas periódicas (vainas de los microtúbulos axiomales centrales) que recubren el propio axonema. También se observó en la pieza media la presencia de derivados mitocondriales (dm), que rodean una única hélice de glucógeno dispuesta de forma espiralada longitudinalmente la extensión del axonema.

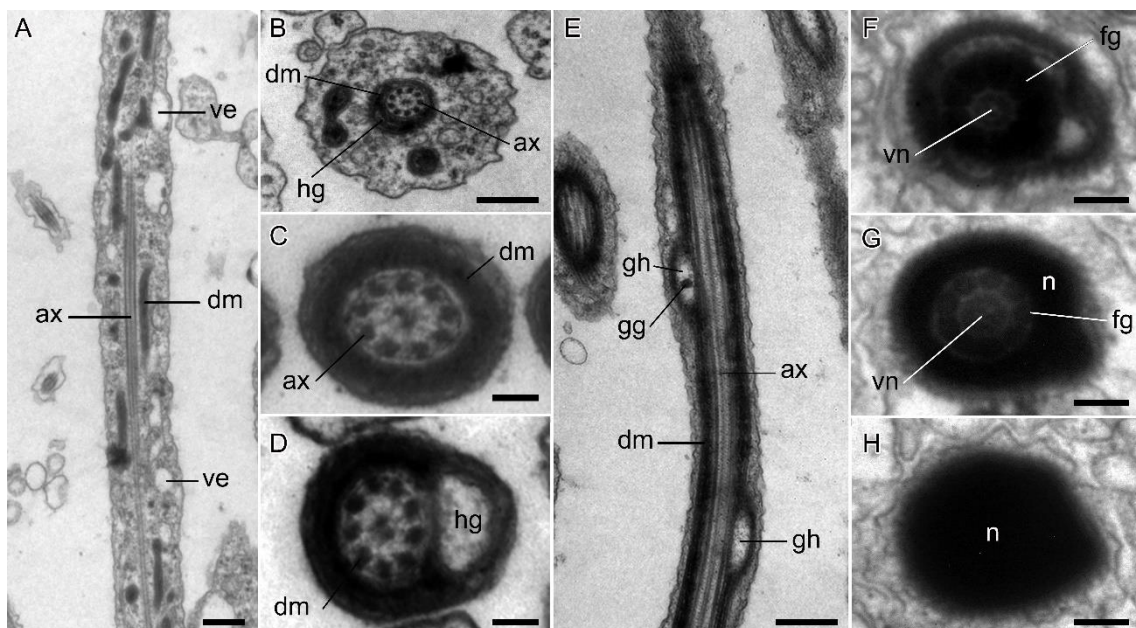


Figura 1.4. Secciones longitudinales (SL) y transversales (ST) de la espermatida y espermatozoide de *S. lessonii*. **A-B**. SL y ST de la espermatida, respectivamente; **C-D**. ST de la pieza media del espermatozoide; **E**. SL de la pieza media del espermatozoide; **F-H**. Secuencia de ST del núcleo del espermatozoide desde la base hasta región media. Abreviaturas: ax, axonema; dm, derivados mitocondriales; fg, fibras gruesas; gg, gránulos de glucógeno; hg, hélice de glucógeno; n, núcleo; ve, vesículas; vn, vaina de los microtúbulos del axonemacentrales. Barra de escala: 0,2  $\mu$ m.

## 1.4. Discusión

Las observaciones del aparato reproductor de *S. lessonii* realizadas en el presente capítulo están en concordancia con descripciones previas para la especie realizadas por Hubendick (1946) en especímenes colectados en Islas Malvinas, y por Olivier y Penchaszadeh (1968) para dos poblaciones de la costa de Mar del Plata. Aunque, con

respecto a lo observado por estos últimos, se hallaron diferencias con respecto a la inserción del conducto del epifalo, donde en el presente estudio observamos la unión de este al órgano accesorio desde porción anterior dorsal.

En general, tanto el aparato reproductivo como las glándulas accesorias reproductivas de otras especies del género *Siphonaria* sp. han recibido gran atención de investigadores, principalmente por motivos taxonómicos (por ejemplo: Marcus y Marcus, 1960; Pal y Hodgson, 2005; Simone y Seabra, 2017; Slama et al., 2020). El aparato reproductivo está compuesto por una serie de órganos, que incluyen una gónada hermafrodita simple (glándula hermafrodita u ovotestis), ducto hermafrodita, espermooviducto (oviespermooviducto), un complejo glandular o glándula del albumen, una bursa copulatrix o espermateca y una glándula del epifalo.

El análisis de la gónada hermafrodita mostró que *S. lessonii* es un organismo hermafrodita simultáneo con ambos gametos femenino y masculino presentes concurrentemente en los acinos de individuos adultos como en otras especies de sifonáridos (Berry 1977, Simpson 1977, Hodgson, Bernard y Lindley, 1991, Pal y Hodgson, 2005). La gónada se encuentra íntimamente asociada al lóbulo derecho de la glándula digestiva, la cual presenta menor tamaño comparado con el lóbulo izquierdo (Landro et al., 2019). El ducto hermafrodita, conectado en su porción proximal a la vesícula seminal, desemboca en el complejo glandular formado por la glándula del albumen y la glándula mucosa, responsables por la secreción de fluido perivitelínico y de capas mocosas que envuelven las ovicápsulas, respectivamente (Luchtel et al., 1977; Pal, 2007). El espermooviducto al igual que en la glándula de epifalo y la bursa copulatrix, se abren al órgano accesorio cerca de la apertura genital común (poro genital), lo que define a los sifonáridos como de sistema monáulico (Marcus y Marcus, 1960; Hyman, 1967; Berry 1977; Hubendick 1978; Hodgson 1999; Pal y Hodgson 2005). Berry (1977), en su revisión de aspectos reproductivos en pulmonados, ha señalado que los órganos copulatorios estructuralmente más simples encontrados en ese taxón corresponden a los descritos para *S. lessonii* y *Williamia peltoides*.

La espermatogénesis en *S. lessonii* se observó en sus primeros estadios de desarrollo intrínsecamente asociada a células germinales del epitelio del acino como lo reportado para otras especies del género (Pal y Hodgson, 2005, Slama et al., 2020) y especies de otros taxones de moluscos (Gamil, 2013; Ying et al., 2008; Torroglosa y Giménez, 2015). Hodgson et al. (1991) señaló el acompañamiento de estos primeros estadios espermátogénicos, hasta la liberación de la espermátida, por una célula somática

a la cual ha determinado en razón de su estructural similitud con células somáticas del epitelio seminífero de mamíferos, como células de Sertoli, las cuales cumplen una función de soporte estructural y metabólico en la espermatogénesis. En este estudio se pudo observar el agrupamiento y asociación de los primeros estadios a células del epitelio del acino pero que no se pudo determinar su naturaleza. Otros trabajos sobre especies de gasterópodos han determinado a este tipo celular como células de Sertoli (Hodgson et al., 2008; Roy et al., 2016; Demin et al., 2020).

La estructura del espermatozoide en sifonáridos es de tipo euespermatozoide uno de los tipos de introesperma y característico de invertebrados marinos con fecundación interna (Hodgson, 1999). *S. lessonii* presentó características compatibles a las descripciones realizadas para otras especies del género (Healy, 1983; Hodgson et al., 1991). El presente trabajo sin embargo no describe la morfología del espermatozoide maduro debido a no haber trabajado con muestras del ducto hermafrodita, visto que la maduración final del gameto masculino no ocurre hasta que este ingrese al ducto hermafrodita donde finalmente termina su desarrollo (Hodgson et al., 1991). No obstante, este es el primer estudio en describir la maduración del gameto masculino para la especie así como de reconocer aspectos estructurales importantes de su anatomía.

## Capítulo 2: Ciclo reproductivo

### 2.1. Introducción

La actividad reproductiva puede consistir en una serie de eventos dentro de un proceso cíclico que en los moluscos marinos de zonas de climas templados está directamente relacionado a los factores ambientales y los cambios climáticos estacionales (Giese y Pearse, 1974). La temperatura, la intensidad y duración del fotoperiodo, y la disponibilidad de nutrientes, fundamentalmente repercuten en la gametogénesis y los eventos de desoves de los ciclos reproductivos de las especies (Lucas, 1965, Hirano e Inaba, 1980; Pal y Hodgson, 2005, Slama *et al.*, 2020). La interacción de los componentes endógenos de los individuos con los factores ambientales determinan características como periodicidad y extensión en el tiempo de los ciclos reproductivos (Lucas, 1965). Además, en las especies marinas, la estacionalidad en la reproducción está generalmente correlacionada con el almacenamiento de gametos maduros y el posterior desove, lo que resulta en una variación significativa de la frecuencia del tamaño de oocitos en todos los miembros adultos de una población durante un breve período (Olive, 1992). La información relativa a los atributos del historial de vida de una especie con respecto al crecimiento, reclutamiento y reproducción representan datos importantes para el análisis estructural y dinámico de las comunidades biológicas (Underwood, 1979).

La reproducción en organismos marinos, en general, está regulada coincidiendo con los incrementos estacionales en la disponibilidad de determinados recursos y, por consiguiente, maximizar la supervivencia y el pleno desarrollo de la descendencia (Collin *et al.*, 2017). Para maximizar su competencia, los invertebrados marinos desarrollaron ante diversos ambientes, diferentes formas de asignar la energía obtenida a través de nutrientes al crecimiento y la reproducción (Ramírez- Llodra, 2002). En el intermareal de zonas tropicales y templadas, los sifonáridos desarrollaron una serie de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento que le permiten establecerse exitosamente en un ambiente complejo y estresor (Branch, 1981; Hodgson, 1999; Przeslawski, 2004; Fischer y Phillips, 2014; Wang *et al.*, 2017).

Los integrantes de la familia Siphonariidae son organismos iteróparos, pudiendo presentar múltiples eventos reproductivos a lo largo de su vida, en los que la mayoría de las especies depositan sus huevos envueltos en masas gelatinosas generalmente

cementadas al substrato (Chambers y McQuaid, 1994b; Hodgson, 1999; Pal y Hodgson, 2005). Estudios previos realizados en el grupo indican una variedad de comportamientos reproductivos con respecto a la estacionalidad de desoves, que pueden extenderse de verano a otoño en dos especies de la costa suroriental australiana (Creese, 1980), hasta periodos desde invierno hasta fines del verano boreal en el Mediterráneo (Ocaña y Emson, 1999). A su vez, el ciclo gametogénico descrito para dos especies de la costa sudafricana ha indicado una marcada estacionalidad en la oogénesis con varios eventos de desove entre el fin de la primavera y el verano, sugiriendo una predilección por desoves parciales para una de las especies estudiadas (Pal y Hodgson, 2005). Además, estos mismos trabajos también señalaron la presencia constante de ambos gametos a lo largo del año.

Aunque numerosos estudios describieron aspectos biológicos y ecológicos de *S. lessonii* en la costa de Buenos Aires (Olivier et al., 1966; Bastida et al., 1971; López Gappa et al., 1993; López Gappa et al., 1996; Tablado y López Gappa, 2001; Nuñez et al., 2014), la gametogénesis y la estacionalidad en la reproducción de esta especie permanecen desconocidas. Por lo tanto, el presente capítulo tiene como objetivo describir el ciclo gametogénico en *S. lessonii*, relacionando la periodicidad de su desarrollo y evacuación en la población que habita el muelle de Villa Gesell con la variación de factores ambientales de la zona para el periodo estudiado.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Recolección de muestras e histología**

Mensualmente treinta especímenes adultos de *S. lessonii* fueron recolectados manualmente al azar durante las mareas bajas diurnas entre junio de 2012 y mayo de 2014 (excepto marzo de 2014 que por condiciones meteorológicas desfavorables que no se pudo acceder a la zona de muestreo) en la población que habita el muelle de la playa de Villa Gesell (37° 16'S; 56° 58'O) en provincia de Buenos Aires. Los individuos recolectados fueron transportados en contenedores a baja temperatura para ralentizar el metabolismo y reducir el estrés. En el laboratorio, los individuos fueron medidos (largo total de concha) con un calibre Vernier ( $\pm 0,01$  mm), disectados y se extrajo la gónada hermafrodita (GH) la cual fue fijada en solución acuosa de Bouin durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la fijación, los tejidos fueron deshidratados en concentraciones ascendentes de etanol hasta 96%. Los tejidos se incluyeron en parafina histológica y fueron seccionados a 5  $\mu$ m de espesor usando un micrótomo Leica RM 2125

para luego ser coloreados con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron observadas con un microscopio óptico (Zeiss Axiostar) y se registraron fotográficamente con una cámara Canon (Canon G10).

### **2.2.2. Desarrollo de la gónada hermafrodita y ciclo gametogénico**

Para describir los ciclos gametogénicos femenino y masculino se seleccionaron aleatoriamente cinco secciones de diferentes regiones de la gónada de cada individuo. Cada sección fue clasificada de forma independiente según las etapas de desarrollo gonadal. Este mismo procedimiento se utilizó para estimar la frecuencia y la talla de los gametos femeninos. Los oocitos con núcleo visible y nucléolo fueron clasificados según el desarrollo gametogénico, cuantificados y medidas en sus áreas ( $\mu\text{m}^2$ ). Las imágenes de cada sección y la morfometría de los oocitos se tomaron con el software AxioVision (2013) 4.8.2. y fueron utilizadas para analizar la relación entre la frecuencia y la talla de los oocitos, las etapas de desarrollo gonadal y su variación mensual. La frecuencia y talla oocitaria se determinaron a partir de cada sección microscópica como el promedio de la cantidad y las áreas de los oocitos de cada estadio, respectivamente.

Se utilizaron dos métodos para estudiar la maduración de las gónadas con relación a la talla y la frecuencia de los oocitos: el primero fue a partir de la distribución de las clases de talla oocitarias; y el segundo consistió en examinar la variación en la talla de los oocitos.

### **2.2.3. Clasificación de estadios oocitarios**

La oogénesis fue clasificada en 3 estadios de maduración para analizar cuantitativamente el desarrollo gonadal. Los oocitos previtelogénicos (OPV) se caracterizaron por pequeñas células basófilas, sin presencia de vitelo y con un área de citoplasma relativamente pequeña en comparación con el área nuclear, pudiendo contener dos o más nucléolos. Oocitos vitelogénicos tempranos (OVT) presentaron forma irregular con aumento del área del citoplasma en razón a la producción de vitelo. Los vitelogénicos maduros (OVM), presentaron el área del citoplasma expandida y completamente ocupada de vitelo.

### **2.2.4. Variables ambientales**

Las variables ambientales (temperatura atmosférica, temperatura de la superficie del mar y período de luz diurna) fueron tomadas para analizar su correlación con los procesos gametogénicos. El fotoperiodo se calculó como la media mensual de la duración del día utilizando los datos obtenidos del registro diario de salida y puesta del sol en Mar del Plata (sitio más cercano), proporcionado por el Servicio de Hidrografía Naval de Argentina (<http://www.hidro.gob.ar>). Temperatura superficial del mar (TSM) se obtuvo desde el sitio web <http://seatemperature.info> registrado en la costa de Villa Gesell, y la temperatura atmosférica (ATM) del INTA (Instituto Nacional de Tecnología de Argentina) disponible también en la red (<http://siga2.inta.gov.ar>). La temperatura media mensual para TSM y ATM se calculó determinando el promedio entre los registros de mínimo y máximo registrados en el día.

### **2.2.5. Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistical Statsoft (versión 7). La normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos analizados fueron calculadas utilizando las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Para evaluar la variación mensual intraespecífica en la talla y en la frecuencia de la media del área oocitaria, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis debido a que los supuestos requeridos por las pruebas paramétricas no se alcanzaron. El Coeficiente de correlación lineal de Pearson fue utilizado para evaluar las relaciones entre la frecuencia y el área de los oocitos vitelogénicos maduros (OVM;  $\mu\text{m}^2$ ) en función los parámetros ambientales, fotoperiodo (horas), TSM ( $^{\circ}\text{C}$ ) y ATM ( $^{\circ}\text{C}$ ). El nivel de significancia fue predeterminado en  $\alpha > 0,05$  para cada análisis.

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Estructura y desarrollo de la gónada hermafrodita**

Después de un examen histológico criterioso de la gónada hermafrodita de *S. lessonii*, se analizó la gametogénesis femenina y masculina por separado en un total de 297 individuos adultos, en un rango de talla entre 9,00 y 21,60 mm de largo de concha (media  $\pm$  DE = 14,30  $\pm$  2,86). Se determinaron cinco estadios de desarrollo gonadal para la porción femenina (Figura 1): proliferación, crecimiento, pre-evacuación, evacuación y post-evacuación. En el estadio de proliferación (Figura 2.1A), los acinos se caracterizaron

por la producción de oogonias en grupos (clusters) y principalmente por la presencia de pequeños OPV asociados a la pared del acino. Durante esta etapa, OVT se observaron ocasionalmente presentes mientras que OVM no fueron hallados. En el estadio de crecimiento (Figura 2.1B), los acinos se comenzaron a llenar integralmente con OVT y algunos OVM junto con OPV. La etapa de pre-evacuación (Figura 2.1C) fue caracterizada por la completa ocupación de los acinos por OVM, expandiendo el área de los acinos y reduciendo el tejido conectivo existente entre ellos. En la etapa de evacuación (Figura 2.1D), se observaron oocitos oblongos y poligonales con el área citoplasmática totalmente ocupada por vitelo. Algunos de estos oocitos se observaron separados de la pared del acino dirigiéndose a la luz del lumen y listos para ser evacuados al ducto hermafrodita. En la post-evacuación (Figura 2.1E, F), los acinos se caracterizaron por la existencia de grandes espacios vacíos, presencia de oocitos atrésicos y restos gametogénicos. En algunos casos, también se pudo observar la presencia de oocitos no evacuados así como el principio de la oogénesis.



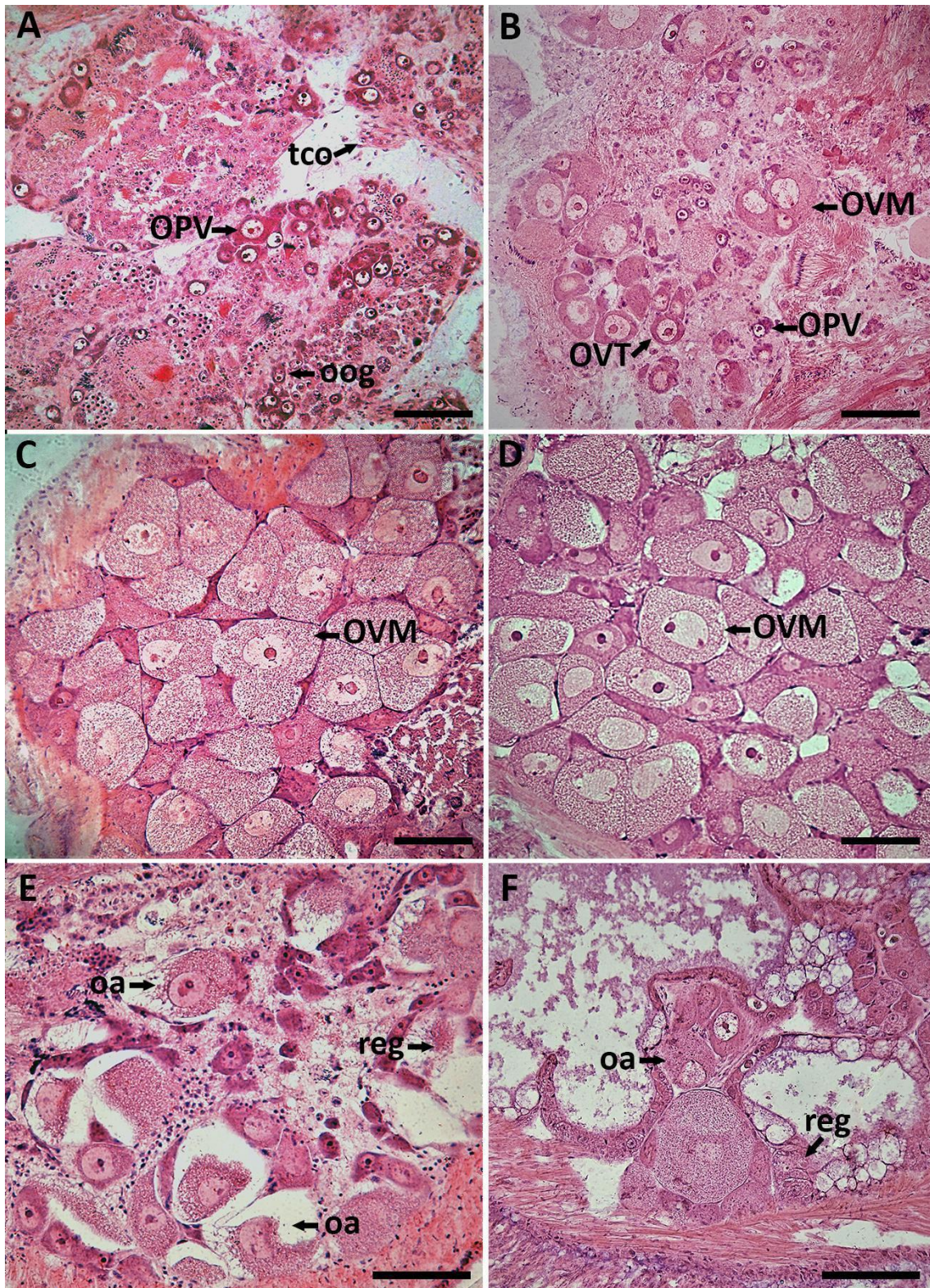


Figura 2.1. Estadios de desarrollo gonadal femenino de *S. lessonii*. **A.** Proliferación, presencia principalmente de oogonias y oocitos pre-vitelogénicos; **B.** Crecimiento, oocitos vitelogénicos premaduros y vitelogénicos maduros; **C.** Pre- evacuación, grandes oocitos vitelogénicos maduros comprimidos dentro de los acinos gonadales; **D.** Evacuación, oocitos vitelogénicos maduros desprendidos de la pared del acino; **E-F.** Post-evacuación, acinos vacíos con restos gametogénicos y oocitos no evacuados. Abreviatura: oog, oogonia; OPV, oocito pre-vitelogénico; OVT, oocito



vitelogénico temprano; OVM, oocito vitelogénico maduro; oa, oocitos atresicos; reg, restos gametogénicos; tco, tejido conectivo. Escalas A, B = 100  $\mu$ m; C-F = 50  $\mu$ m.

La gametogénesis masculina fue clasificada en cuatro estadios distintos de desarrollo (Figura 2.2). El estadio de desarrollo temprano (Figura 2.2A) se caracterizó por acinos que contienen principalmente espermatoцитos. En la etapa de diferenciación (Figura 2.2B), los acinos contienen principalmente espermatoцитos y espermátidas. En el estadio de madurez (Figura 2.2C), se observaron acinos principalmente con espermátidas y espermatozoides maduros. Finalmente, después de la evacuación de los espermatozoides maduros, los acinos presentaron algunos restos espermatoгénicos y espacios vacíos en el lumen, lo que corresponde al estadio de post-evacuación (Figura 2.2D).

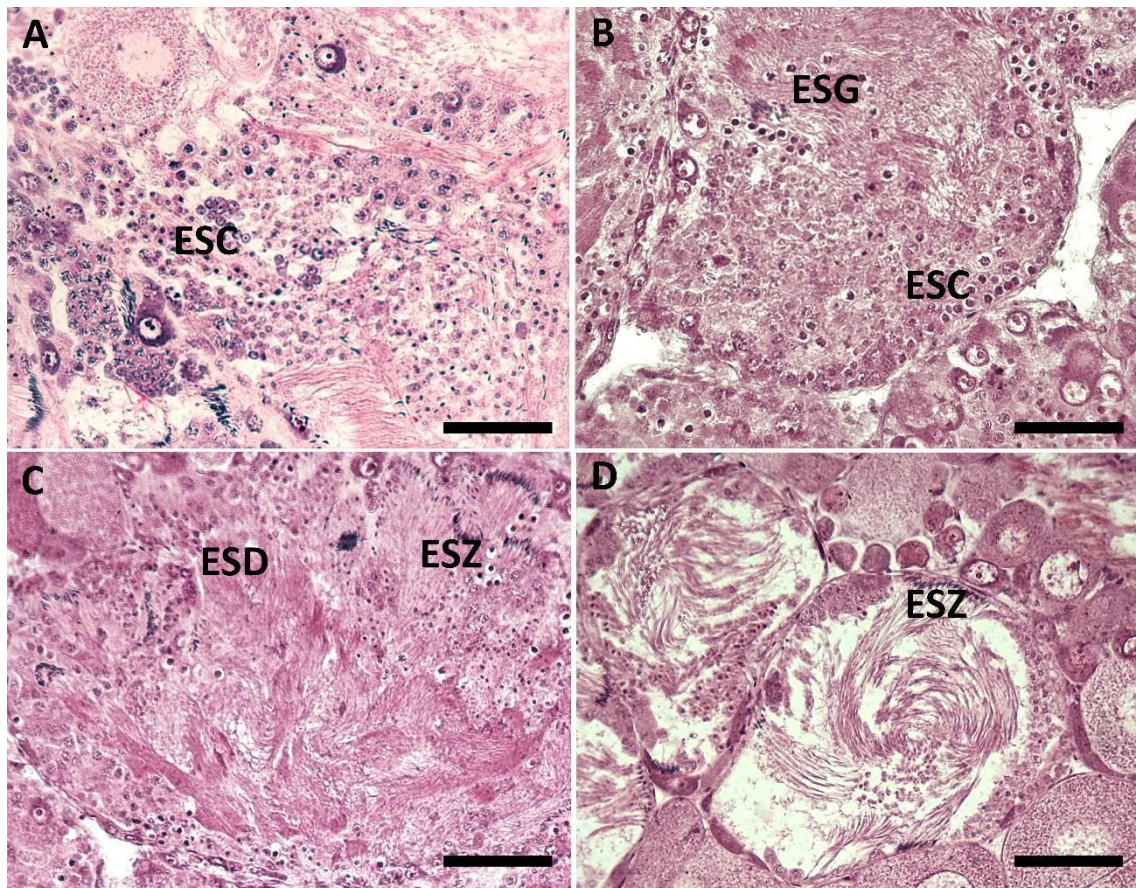


Figura 2.2. Estadios de desarrollo gonadal masculino. **A.** Desarrollo temprano, principalmente espermatoцитos. **B.** Estadio de diferenciación, numerosas espermatogonias y espermatoцитos en la periferia del acino. **C.** Maduro, presencia de espermatozoides maduros. **D.** Post-evacuación, acinos vacíos o con restos gametogénicos. Abreviaturas: ESC, espermatoцитos; ESD, espermátidas; ESG, espermatogonia; ESZ, espermatozoides. Escalas A-D 100  $\mu$ m.

### 3.3.2. Reproducción estacional

La gametogénesis fue observada como un proceso continuo durante todo el período de estudio con producción de ambos gametos femeninos y masculinos en individuos adultos durante todo el año.

El análisis del desarrollo de la GH mostró una variación en la frecuencia relativa de los estadios gametogénicos femeninos (Figura 2.3). En el primer año, fue observada una alta frecuencia de acinos en post-evacuación desde diciembre de 2012 hasta abril de 2013, abarcando todo el verano austral y principios del otoño, mientras que en el segundo año de recolección los acinos en post- evacuación presentaron una mayor frecuencia desde diciembre de 2013 hasta febrero de 2014, dos meses antes que el año anterior. No obstante, algunas pocas secciones en post-evacuación también pudieron observarse en meses anteriores. La proliferación de células femeninas presentó su máxima frecuencia en abril y mayo de 2013 y en febrero y abril de 2014, mientras que, las etapas de crecimiento y pre-evacuación tuvieron un aumento sus frecuencias, sucesivamente, desde junio a noviembre en 2012 y en 2013, otoño a primavera austral.

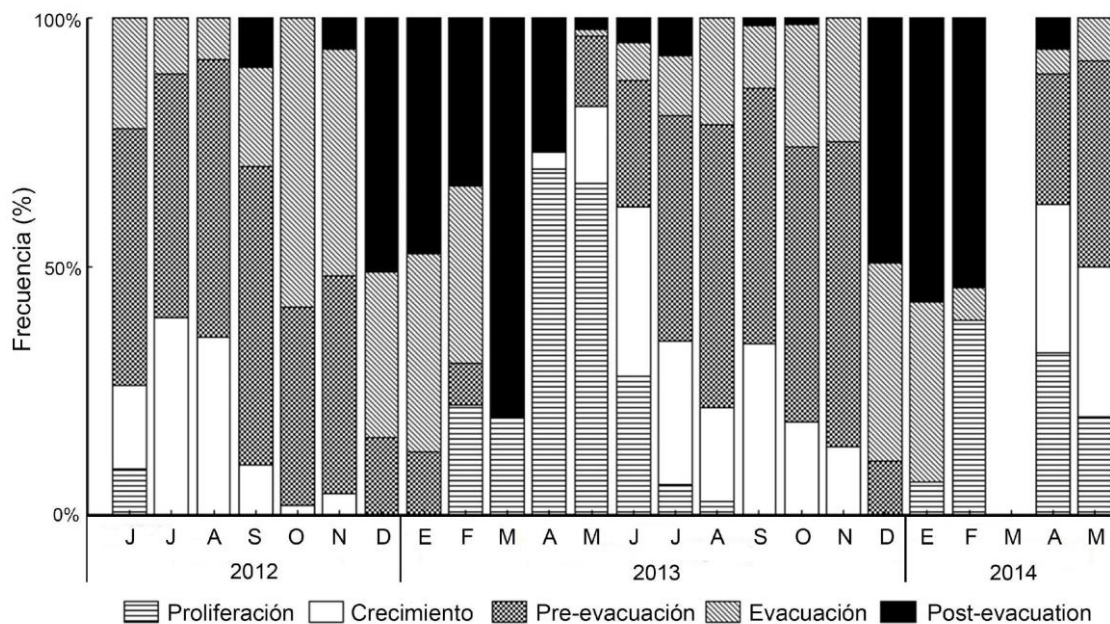


Figura 2.3. Frecuencia relativa mensual de los estadios de desarrollo gonadal femenino en *S. lessonii* observada desde junio de 2012 a mayo de 2014. Proliferación, crecimiento, pre-evacuación, evacuación y post-evacuación.

La gametogénesis en la porción masculina también se observó continua durante los 2 años de estudio (Figura 2.4). El inicio de la gametogénesis, con individuos en estadio



de desarrollo temprano, se observó en verano, siendo las frecuencias más altas en marzo de 2013 y febrero de 2014. La diferenciación de las células germinales masculinas ocurrió con mayor frecuencia entre junio y noviembre en 2012 y de abril a septiembre en 2013, desde otoño a primavera en ambos años. El estadio de evacuación, fue hallado en la mayoría de las secciones analizadas, se observaron durante todo el año, pero con mayor frecuencia durante el invierno y la primavera, entre agosto y noviembre de 2013 y entre julio y noviembre de 2014. Los individuos en estadio de post-evacuación fueron hallados en mayor frecuencia en los meses de diciembre a marzo de 2013 y noviembre y febrero de 2014, abarcando el final de la primavera y el comienzo del verano austral.

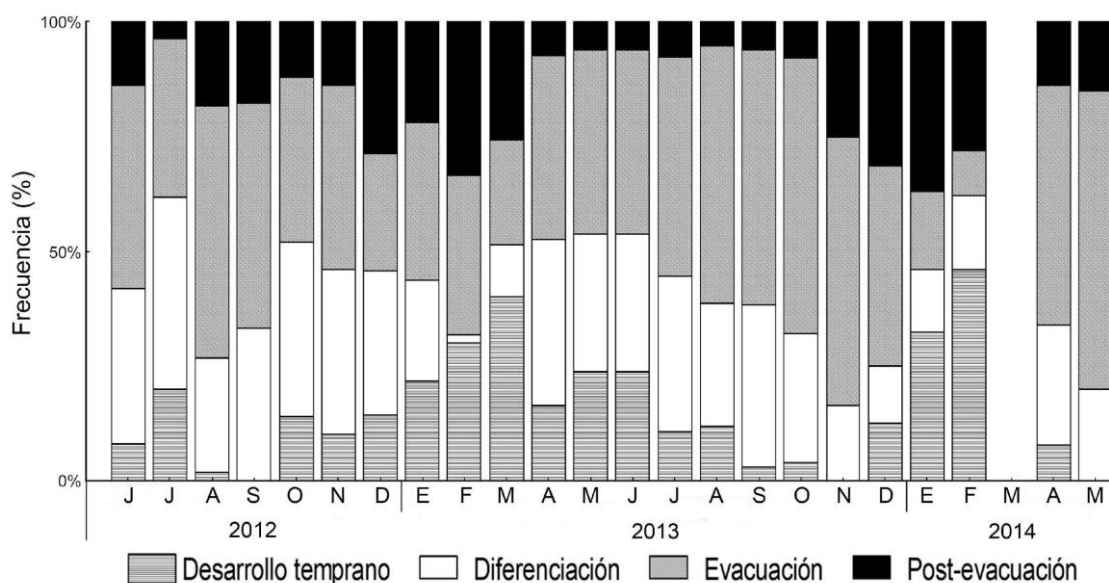


Figura 2.4. Frecuencia relativa de estadios gonadales masculinos en *S. lessonii*, entre los meses de junio de 2012 a mayo de 2014. Desarrollo temprano, diferenciación, evacuación y post-evacuación.

### 2.3.3. Talla y distribución de los oocitos en los estadios gonadales

Un total de 12.775 oocitos fueron contabilizados, medidos y clasificados de acuerdo con su desarrollo, correspondiendo a 1075 secciones y 215 individuos analizados histológicamente. Se calcularon la media cuantitativa de los oocitos para cada estadio de desarrollo gonadal, como el número de oocitos por el total de sección histológica por estadio analizado, además de la media, el desvío estándar, las tallas mínimas y máximas del área del oocito ( $\mu\text{m}^2$ ) para cada etapa de desarrollo de GH. (Tabla 2.1). La media tanto del número de oocitos como de la talla aumentaron desde la etapa de proliferación (3,73 y  $226,82 \pm 165,06 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) hasta la etapa de evacuación (12,02 y  $1007,64$

$\pm 988,73 \mu\text{m}^2$ , respectivamente), y disminuyeron secuencialmente en la etapa posterior a la evacuación ( $4,04$  y  $726,71 \pm 823,09 \mu\text{m}^2$ , respectivamente).

Estadios de desarrollo gonadal	Número de secciones analizados	Número de oocitos medidos	Media de oocitos	Talla oocitaria media $\pm$ DE ( $\mu\text{m}^2$ )	Talla mínima ( $\mu\text{m}^2$ )	Talla máxima ( $\mu\text{m}^2$ )
Proliferación	215	802	3,73	226,82 $\pm$ 165,06	35,45	1100,61
Crecimiento	220	2129	9,68	734,57 $\pm$ 799,88	38,30	5785,46
Pre- evacuación	457	5319	11,64	915,25 $\pm$ 951,20	45,84	6110,43
Evacuación	290	3486	12,02	1007,64 $\pm$ 988,73	45,71	6843,42
Post- evacuación	257	1039	4,04	726,71 $\pm$ 823,09	43,70	5037,13

Tabla 2.1. Resumen de datos relacionados a la talla y frecuencia del área oocitaria para los estadios de desarrollo de la gónada hermafrodita. Proliferación, crecimiento, pre-evacuación, evacuación y post-evacuación; n, número de oocitos; media; DE, desvío estándar; mínimo y máximo valor del área oocitaria.

La distribución de las clases de tallas oocitarias mostró que el número de oocitos pequeños ( $0-400 \mu\text{m}^2$ ) que disminuyó desde el estadio de proliferación al de evacuación, mientras que la frecuencia de los oocitos más grandes ( $> 1000 \mu\text{m}^2$ ) aumentó junto con el desarrollo gametogénico (Figura 2.5).

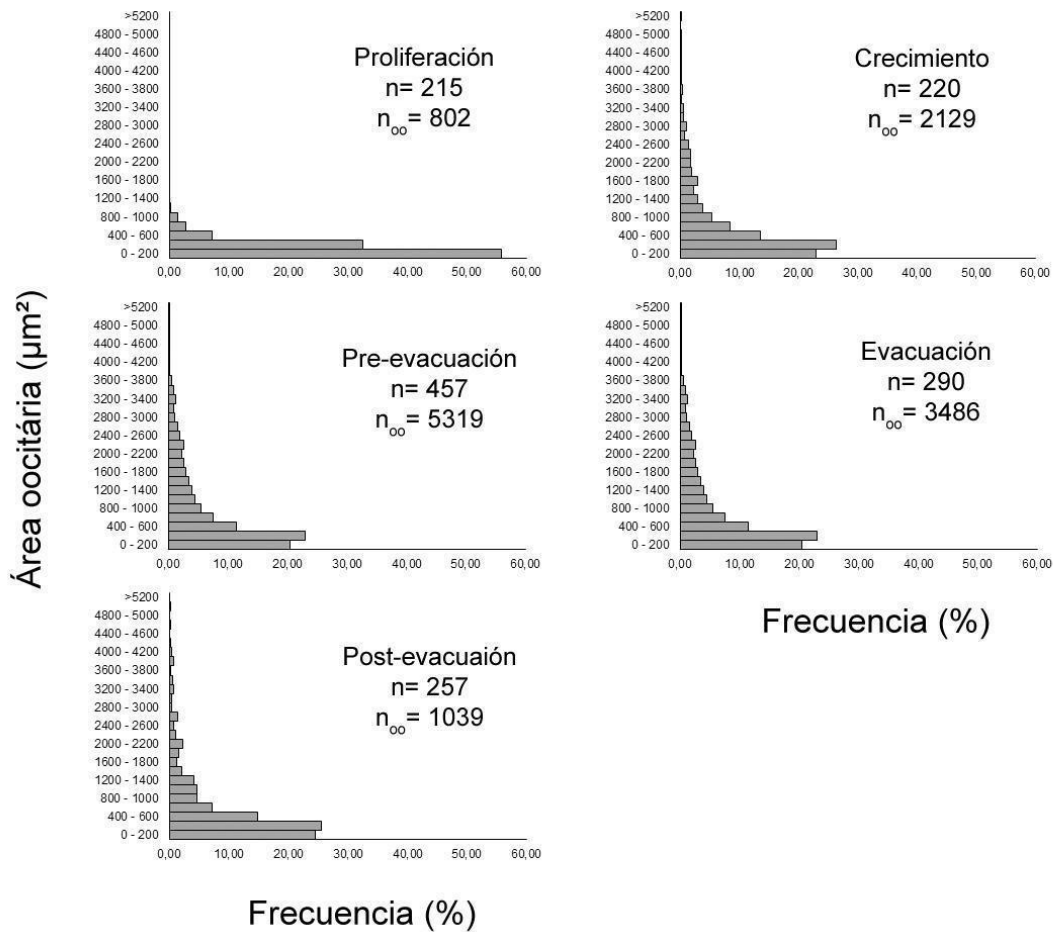


Figura 2.5. Distribución de las frecuencias de clase de área oocitarias (µm<sup>2</sup>) para las diferentes etapas de desarrollo gonadal estudiadas en *S. lessonii*. n, número de secciones analizadas; n<sub>oo</sub>, número de oocitos. Proliferación, crecimiento, pre-evacuación, evacuación y post-evacuación.

El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis presentó también variación significativa en las tallas oocitarias con respecto a los estadios de desarrollo gonadal para los 3 estadios de clasificación, OPV (H = 123,01, gl = 4, p <0,001), OVT (H = 42,89, gl = 4, p <0,001) OVM (H = 22,48, gl = 3, p <0,001). Las tallas más grandes fueron observadas para OPV en el estadio de evacuación (209,13 ± 85,96 µm<sup>2</sup>; Figura 2.6A), mientras que OVT y OVM, presentaron tallas mayores en pre-evacuación (628,87 ± 209,74 µm<sup>2</sup> y 2111,20 ± 854,19 µm<sup>2</sup>) y evacuación (620,88 ± 207,44 µm<sup>2</sup> y 2134,96 ± 857,53 µm<sup>2</sup>), respectivamente (Figura 3.6B, C). Las tallas presentaron valores significativamente bajos para OPV y OVT en proliferación (168,43 ± 78,75 µm<sup>2</sup> y 520,54 ± 172,46 µm<sup>2</sup>; Figura 2.6A, B) mientras que para OVM se hallaron tanto en crecimiento (1980,96 ± 788,82 µm<sup>2</sup>) como en post-evacuación (1969,94 ± 876,94 µm<sup>2</sup>) (Figura 2.6C).

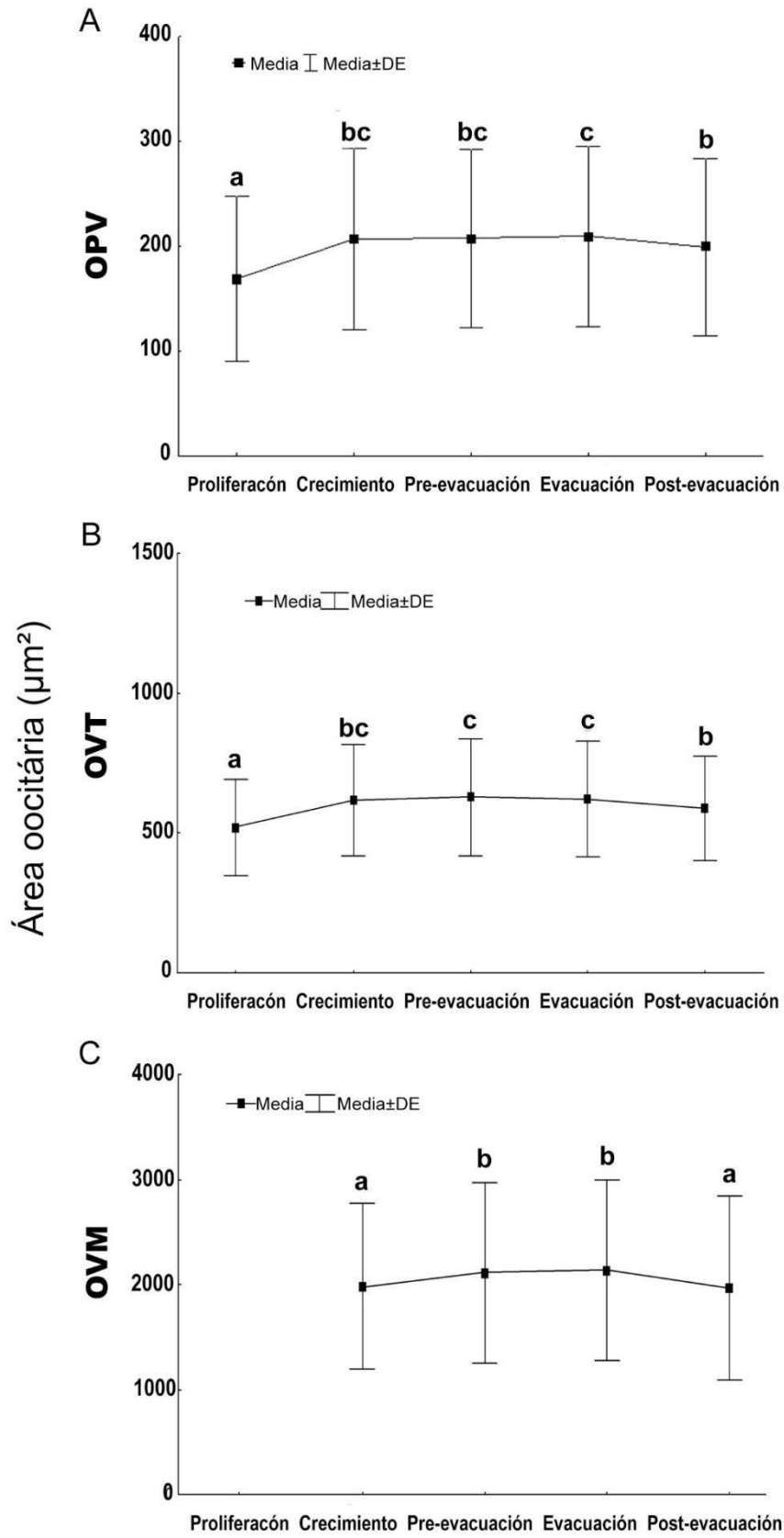


Figura 3.6. Área de oocitos (media  $\pm$  DE;  $\mu\text{m}^2$ ) en relación con los estadios de desarrollo gonadal de *S. lessonii*. **A.** Oocitos previtelogénicos (OPV); **B.** Oocitos previtelogénicos (OVT); **C.** Oocitos vitelogénicos maduros (OVM).

### 3.3.4. Talla y frecuencia de los estadios de oocitos

Oocitos de los tres estadios fueron observados continuamente a lo largo de los dos años de este estudio, presentando diferencias en cuanto a las frecuencias mensuales. Durante el invierno y la primavera se observaron gónadas con mayor número promedio de OPV y OVT, mientras que el número de OVM comenzó a aumentar durante el invierno alcanzando su mayor número al principio de la primavera para enseguida disminuir hasta el final del verano. El número promedio mensual de oocitos (Figura 2.7A) presentó variaciones significativas para los tres estadios (Kruskal-Wallis; OPV,  $H = 265,44$ ,  $gl = 23$ ,  $p < 0,001$ ; OVT,  $H = 351,81$ ,  $gl = 23$ ,  $p < 0,001$ ; OVM,  $H = 441,17$ ,  $gl = 23$ ,  $p < 0,001$ ). Se observó un valor medio significativamente mayor en septiembre de 2013 ( $9,57 \pm 4,70$ ) y agosto ( $9,72 \pm 4,98$ ) para OPV, mientras que para OVT fue mayor en septiembre de 2013 ( $6,61 \pm 3,35$ ). El número de OVM fue mayor en octubre de 2012 ( $7,24 \pm 6,62$ ) y septiembre de 2013 ( $6,63 \pm 3,09$ ), mientras que abril de 2013 ( $0,09 \pm 0,36$ ) y abril de 2014 ( $0,20 \pm 0,47$ ) fue cuando se encontraron los valores más bajos en el primer y segundo año, respectivamente.

La variación en el área de OPV fue de 35,45 a 486,42.50  $\mu\text{m}^2$  ( $202,05 \pm 85,45 \mu\text{m}^2$ ), mientras que en OVT de 264,69 a 1252,40  $\mu\text{m}^2$  ( $617,11 \pm 205,13 \mu\text{m}^2$ ) y OVM de 888,74 a 6843,42  $\mu\text{m}^2$  ( $2062,32 \pm 850,07 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 2.7B). El análisis de la variación mensual en la talla de los oocitos mostró diferencias significativas para todas las etapas descritas (Kruskal-Wallis; OPV,  $H = 144,27$ ,  $gl = 22$ ,  $p < 0,001$ ; OVT,  $H = 66,11$ ,  $gl = 22$ ,  $p < 0,001$ ; OVM,  $H = 100,20$ ,  $gl = 22$ ,  $p < 0,001$ ). Mayo de 2013 ( $165,08 \pm 49,87 \mu\text{m}^2$ ) y abril de 2013 ( $166,95 \pm 58,01 \mu\text{m}^2$ ) presentaron las menores tallas para OPV, mientras que octubre de 2013 ( $259,36 \pm 63,41 \mu\text{m}^2$ ) presentó las tallas más grandes. Además, se halló que las medias de las áreas oocitárias para OVT fueron menores en abril de 2014 ( $517,90 \pm 103,24 \mu\text{m}^2$ ) y las medias mayores fueron en agosto de 2013 ( $640,64 \pm 116,31 \mu\text{m}^2$ ), octubre de 2013 ( $649,90 \pm 123,33 \mu\text{m}^2$ ) y agosto de 2012 ( $660,22 \pm 131,61 \mu\text{m}^2$ ). Los OVM presentaron los valores medios que fueron significativos más pequeños en abril de 2013 ( $1550,37 \pm 521,22 \mu\text{m}^2$ ), abril de 2014 ( $1608,57 \pm 377,05 \mu\text{m}^2$ ), junio de 2013 ( $1647,86 \pm 458,97 \mu\text{m}^2$ ), julio de 2012 ( $1858,67 \pm 456,87 \mu\text{m}^2$ ), septiembre de 2012 ( $1933,97 \pm 690,38 \mu\text{m}^2$ ) y julio de 2013 ( $1895,09 \pm 609,94 \mu\text{m}^2$ ), mientras que se



observaron los valores medios más grandes para diciembre de 2013 ( $2218,66 \pm 643,21 \mu\text{m}^2$ ), agosto de 2013 ( $2259,11 \pm 582,29 \mu\text{m}^2$ ), septiembre de 2013 ( $2171,16 \pm 325,59 \mu\text{m}^2$ ), enero de 2014 ( $2291,41 \pm 657,03 \mu\text{m}^2$ ), noviembre de 2012 ( $2202,95 \pm 445,29 \mu\text{m}^2$ ), junio de 2012 ( $2202,53 \pm 409,50 \mu\text{m}^2$ ) y mayo de 2014 ( $2482,47 \pm 1122,30 \mu\text{m}^2$ ).

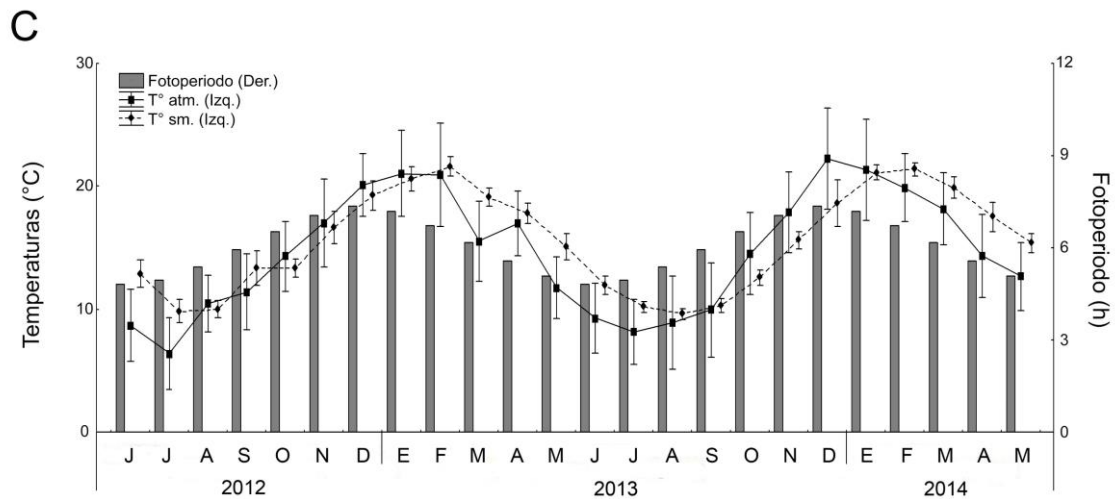
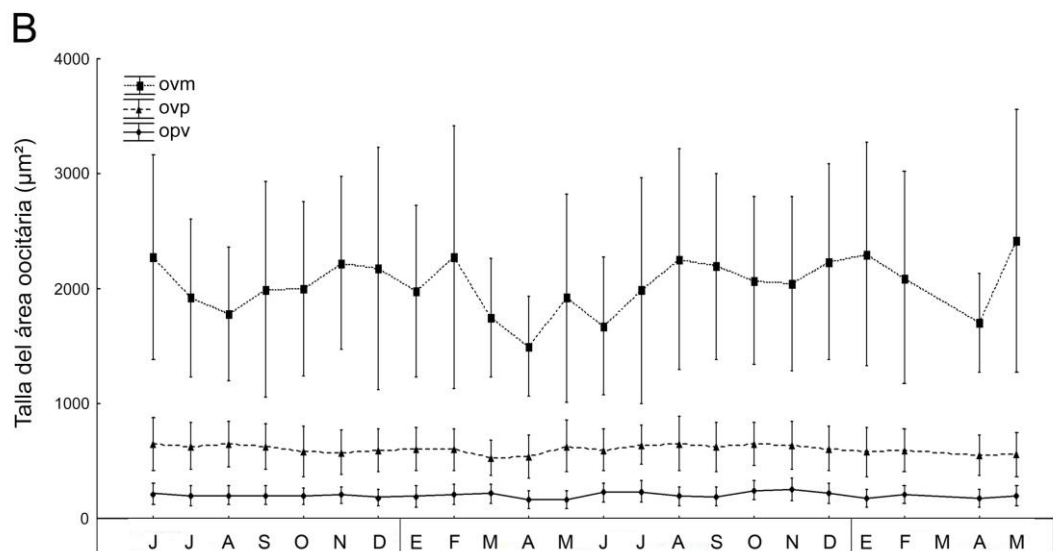
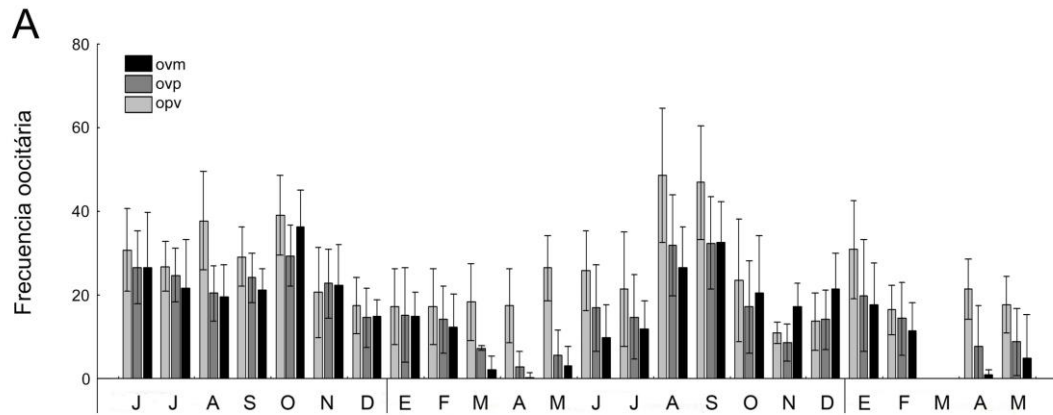


Figura 2.7. Variación mensual de la frecuencia y área oocitaria (por sección microscópica) para los diferentes estadios de desarrollo oocitario de junio de 2012 a mayo de 2014. **A.** Frecuencia ( $\pm$  DE) de los estadios de los oocitos. **B.** Talla promedio ( $\pm$  SD) de los oocitos ( $\mu\text{m}^2$ ). **C.** Valores promedios ( $\pm$  DE) de las temperaturas atmosféricas (ATM) y de la superficie del mar (TSM); la barra del eje secundario indica el fotoperíodo (h). Oocitos previtelogénicos (OPV); oocitos vitelogénicos tempranos (OVT); oocitos vitelogénicos maduros (OVM).

### 3.3.5. Variables ambientales y reproducción

El fotoperíodo (DL) varió de 9,6 horas en junio a 14,7 horas de extensión en diciembre. La prolongación del fotoperíodo fue acompañada por un aumento en la temperatura de la superficie del mar (TSM) y de la temperatura atmosférica (ATM), con una pequeña diferencia entre los años de recolección. En el primer año estudiado (2012-2013), la TSM media fue de 6,39 °C en julio y de 21,05 °C en enero y la ATM promedio fue de 9,84 °C en julio y de 21,61 °C en febrero. En el segundo año (2013-2014), la TSM media fue de 8,16 °C en julio y de 22,28 °C en diciembre y la ATM promedio fue de 9,61 °C en agosto y de 21,39 °C en febrero (Figura 2.7C). El análisis estadístico mostró una correlación negativa entre la frecuencia OVM y ATM ( $n = 23$ ;  $r = 0,55$ ;  $p = 0,007$ ).

## 2.4. Discusión

El análisis de la variación mensual de la frecuencia de los estadios gonadales, la frecuencia de los estadios oocitarios y la variación en la talla promedio del área de los oocitos ( $\mu\text{m}^2$ ) indican que la población estudiada de *S. lessonii* en el muelle de Villa Gesell presenta un ciclo reproductivo anual. La producción de oocitos como de espermatozoides fueron observados como un proceso continuo a lo largo de los 2 años de estudio. La proliferación de células femeninas ocurrió predominantemente en los meses de abril/mayo (Figura 2.3), comienzo del otoño, coincidiendo con las bajas en las temperaturas atmosféricas y de superficie del mar que, a su vez, están asociadas al inicio de la reducción del fotoperíodo. A partir de este momento, el área de los oocitos aumenta gradualmente hasta noviembre/diciembre (fin de primavera) coincidiendo también con un aumento en el número de individuos encontrados en evacuación y/o post-evacuación. En el período anterior a la evacuación, observamos que la gónada hermafrodita de *S. lessonii* aumenta considerablemente de tamaño, expandiéndose eventualmente a la cavidad del manto, comprendiendo el período final de maduración de los gametos femeninos.

Además, el presente trabajo también ha demostrado que aunque los oocitos maduros (OVM) pudieron ser distinguidos en la gónada de individuos adultos durante todo el año, la evacuación (desove) ocurrió fundamentalmente desde el invierno (junio de 2012 y agosto de 2013) hasta el comienzo del verano austral (febrero de 2013 y enero 2014), con picos destacados en los meses de primavera (octubre de 2012 y diciembre de 2013), cuando las frecuencias relativas de los individuos en el periodo de evacuación fueron más altas. Este resultado es similar con las observaciones de Olivier y Penchaszadeh (1968) sobre el periodo de desove en una población de *S. lessonii* en las costas rocosas de Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, que indicaron la presencia de masas ovíferas desde junio hasta marzo. Sin embargo, es importante señalar que durante las recolecciones en el periodo otoñal se pudo observar ocasionalmente masas de huevos cementadas sobre los pilotes del muelle de Villa Gesell.

El desarrollo gametogénico masculino también fue continuo y sincrónico con el proceso femenino a lo largo del período estudiado. La frecuencia del estadio de evacuación aumentó durante el invierno y en primavera, seguido de un aumento en el estadio de post-evacuación a fines de primavera y que se extendió hasta el verano (Figura 2.4). Pal y Hodgson (2005) indicaron que la espermatogénesis en *S. serrata* se produce continuamente presentando mayor actividad durante el final del invierno y los primeros meses de la primavera. Estos autores también observaron un periodo más breve en la frecuencia mensual de desoves en comparación con este estudio. A pesar de que estos organismos pueden almacenar espermátóforos ajenos en su espermateca, los cuales contienen los espermatozoides, *S. lessonii* también sincronizaría la evacuación para maximizar la fecundación con la posibilidad de fecundación cruzada.

La caracterización de los estadios de desarrollo gonadal mediante el análisis de la distribución de las tallas oocitárias indicó que el número de oocitos aumentó en conjunto con el desarrollo de la gónada, con una mayor presencia de células pequeñas ( $<400 \mu\text{m}^2$ ) durante los estadios tempranos de maduración de las gónadas (proliferación) y de oocitos más grandes ( $>1000 \mu\text{m}^2$ ) durante los estadios más avanzados de maduración (pre-evacuación y evacuación) (Figura 2.5). La talla promedio de los oocitos también aumentó desde el estadio de proliferación hasta el de evacuación (Tabla 2.1), cuando los oocitos OVT crecieron de  $226,82 (\pm 165,06) \mu\text{m}^2$  a  $1007,64 (\pm 988,73) \mu\text{m}^2$ . La misma tendencia fue encontrada midiendo el diámetro oocitário, también a través del análisis de imágenes, en varias especies de gasterópodos como *Buccinum isaotakii* (Ilano et al., 2003), *Megalobulimus abbreviatus* (Horn et al., 2005), *Anodontites trapesialis* (Calil y Mansur,

2007) y *Melampus coffeus* (Maia et al., 2012). Además, se observó un patrón similar de desarrollo de oocitos entre los estadios oocitários en relación con la maduración de las gónadas (Figura 2.7). Después de la evacuación, la talla de los oocitos disminuyó en el estadio de post-evacuación, aunque todavía se pudieron encontrar oocitos maduros no evacuados dentro de los acinos. El ciclo gametogénico también presentó una variación en el número de oocitos entre los estadios. En el comienzo del ciclo gametogénico, la proliferación se caracterizó por presentar un bajo número de oocitos, en general de tallas pequeñas, predominantemente previtelogénicos. Luego, el número y la talla de los oocitos aumentan hacia la evacuación, cuando alcanzaron sus valores más altos en ambos criterios. Seguido a la evacuación, la gónada presentó una disminución en el número y la talla de los oocitos (estadio post-evacuación).

También es importante señalar que en el estadio de post-evacuación hubo un aumento en la presencia de OPV en relación con la etapa de evacuación, esto indica la capacidad regenerativa temprana de la gonadal después de la evacuación de los gametos femeninos.

Hodgson (1999) indicó que las especies de sifonáridos de zonas templadas presentan desove estacional, mientras que las de las zonas tropicales y subantárticas son reproductivamente activas durante todo el año, aunque algunas pueden presentar picos de desove. Hodgson (1999) también advirtió que, en especies con ciclos anuales de desove, la gametogénesis podría ser estacional. La población estudiada en el presente trabajo mostró una actividad gametogénica continua con una estacionalidad distintiva en su reproducción, a pesar de que se encontraron desoves ocasionales fuera de este período. Creese (1980) observó que *Siphonaria denticulate* y *Siphonaria virgulata* desovan desde el verano hasta el otoño en el hemisferio sur a pesar de la presencia de oocitos maduros en la gónada hermafrodita en la mayor parte del año. Ocaña y Emson (1999) observaron estacionalidad en el desove de *Siphonaria pectinata* en la costa de Gibraltar (hemisferio norte), abarcando períodos desde el final del invierno hasta el final del período estival (de marzo a septiembre), con frecuencias mayores en mayo y junio (Tabla 2.2).

Los resultados sugirieron correspondencia entre el número promedio de oocitos y el área oocitária con relación a la maduración gonadal durante el período estudiado. El número y la talla de los oocitos mostraron valores bajos para ambos análisis en las tres etapas durante los meses de otoño, cuando la mayoría de las gónadas analizadas se encontraban en etapas de proliferación y crecimiento. En este sentido, solo los OPV presentaron mayor frecuencia durante dicho período. Para la primavera, la gónada

aumentó en tamaño presentando mayor cantidad de oocitos y de mayor talla, este incremento coincidió con los meses en que la mayoría de los individuos se encontraban en evacuación y en post-evacuación

Especies	Referencias	Localidad	Desove														
			Otoño			Invierno			Primavera			Verano					
Boreal			S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A			
<i>Siphonaria japonica</i>	Abe (1940)	Japón (40°54'N)												.....			
<i>Siphonaria pectinata</i>	Ocaña y Emson (1999)	Gibraltar (36°07'N)	....											.....			
<i>Siphonaria pectinata</i>	Dieuzeide (1935)	Algeria (36°N)		.....													
<i>Siphonaria japonica</i>	Hirano (1980)	Japón (34°22'N)												.....			
<i>Siphonaria sirius</i>	Iwasaki (1993a)	Japón (33°42'N)												.....			
<i>Siphonaria pectinata</i>	Zischke (1974)	Florida, EUA (25°)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
<i>Siphonaria pectinata</i>	Voss (1959)	Florida, EUA (25°)				.....	.....	.....									
<i>Siphonaria alternata</i>	Zischke (1974)	Florida, EUA (25°)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
<i>Siphonaria palmata</i>	Collin et al. (2017)	Panamá (8°N)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
<i>Siphonaria gigas</i>	Levings y Garrity (1986)	Panamá (8°N)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
<i>Siphonaria hispida</i>	Marcus y Marcus (1960)	São Paulo, Brasil (23°27'S)												.....			
<i>Siphonaria capensis</i>	Pal y Hodgson (2005)	Sudáfrica (33°42'S)	....											.....			
<i>Siphonaria denticulata</i>	Creese (1980)	Sydney, Australia (34°S)		.....										.....			
<i>Siphonaria compressa</i>	Allanson y Msizi (2010)	Sudáfrica (34°03'S)												.....			
<i>Siphonaria concinna</i>	Chambers (1994)	Sudáfrica (35°S)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
<i>Siphonaria serrata</i>	Chambers (1994)	Sudáfrica (35°S)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
<i>Siphonaria diamenensis</i>	Quinn (1988b)	Victoria, Australia (38°S)	.....											.....			
<i>Siphonaria tasmanica</i>	Quinn (1983)	Victoria, Australia (38°S)												.....			
<i>Siphonaria lessoni</i>	presente trabajo	Buenos Aires, Argentina (37°16'S)												.....			
<i>Siphonaria lessoni</i>	Olivier y Penchazsadeh (1968)	Buenos Aires, Argentina (38°03'S)	....											.....			
<i>Siphonaria zelandica</i>	Davies (1996)	Kaikoura, Nueva Zelanda (42°24'S)	.....	.....	.....	.....	.....	.....									
			Austral			M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F

..... desove

..... picos de desove

Tabla 2.2. Resumen de los períodos de desove de *Siphonaria sp.* con relación a la distribución latitudinal en los hemisferios norte y sur.

Varios estudios informaron una correlación entre el desarrollo gametogénico y los factores ambientales, particularmente la temperatura y la disponibilidad de alimentos para invertebrados marinos (Hirano e Inaba, 1980). Los resultados de este estudio indicaron que la estacionalidad en la reproducción de *S. lessonii* en Villa Gesell coincidió con un aumento en las temperaturas de la superficie del mar y atmosféricas asociados a la extensión del fotoperiodo. La gónada fue observada en estadios de evacuación, con oocitos completamente desarrollados, y post-evacuación desde la primavera hasta el verano austral, por lo que la reproducción se produce durante los meses más calurosos del año en la región. En un ambiente fisiológicamente estresante como las costas rocosas de la zona intermareal, las altas temperaturas pueden exponer las masas ovígeras y el desarrollo embrionario durante las mareas bajas diurnas a una desecación severa (Przeslawski et al., 2005). El calor también puede afectar a individuos adultos como apunta Liu (1994) en observaciones sobre la mortalidad de *S. japonica* en Hong Kong y también Quinn (1988a) acerca de la inanición de *S. diamenensis* debido a la falta de disponibilidad de alimentos, ya que la productividad de algas disminuye durante el verano según indicado en la costa australiana. Además, la temperatura de la superficie del mar puede estar relacionada con el tiempo del desarrollo y la supervivencia de la larva planctotrófica en el ambiente marino, ya que el período de desarrollo larval podrá ser relativamente más corto si nutrición y temperatura son óptimas y más extenso si las condiciones son adversas (Pechenik 1984; Hoegh-Guldberg y Pearse, 1995; Pechenik et al., 2003). En ese sentido, la probabilidad de que las larvas planctotróficas sean depredadas aumenta cuanto mayor el tiempo que esta permanece en la columna de agua y más pequeño sea su talla (Thorson, 1950). Igualmente, Hirano e Inaba (1980) publicaron un estudio informando la diferencia entre los períodos de desove en dos poblaciones diferentes de *S. japonica* comparando los resultados con los de Abe (1940) y sugirieron una correlación con la variación en la temperatura del agua del mar.

*S. lessonii* es una especie hermafrodita simultánea que presenta una actividad gametogénica continua en el sitio estudiado, el muelle de Villa Gesell, produciendo oocitos y espermatozoides durante todo el año. Tal estrategia de reproducción combinada con un modo de desarrollo que incluye una larva velíger planctotrófico libre natante permite a esta especie establecerse exitosamente a lo largo de la costa del suroeste del Océano Atlántico. Varios autores (Marshall y McQuaid, 1991; Marshall y McQuaid, 1992; Gray y Hodgson, 1997; Hodgson, 1999; Marshall, et al., 2004) atribuyeron el éxito de los sifonáridos a su fisiología (anaerobiosis, depresión de la tasa metabólica, tolerancia

térmica), sus adaptaciones ecológicas y su comportamiento. La combinación de estos atributos sugiere a *S. lessonii* como una especie altamente competitiva en la zona del intermareal, posibilitando la colonización de estructuras artificiales de sustratos duros introducidas o dispuestas en las costas marítimas, lo que le permitiría expandir su distribución geográfica.



## Capítulo 3: Madurez sexual

### 3.1. Introducción

Los moluscos presentan una gran diversidad de sistemas y estrategias reproductivas. Entre los taxones de gasterópodos encontramos grupos esencialmente de sistemas dioicos, como Prosobranchia, mientras que se estima que aproximadamente el 40% presentan alguna forma de hermafroditismo (Heller, 1993). Entre los pulmonados habría predominancia de hermafroditas de tipo simultáneo (Heller, 1993). Los sifonáridos, a su vez, son un grupo exclusivamente hermafrodita (Hodgson, 1999). Hubendick (1978), basándose en la descripción realizadas en *S. hispida* (Marcus y Marcus, 1960) y en *S. pectinata* (Zischke, 1974), sostiene que presentan hermafroditismo de tipo protándrico, con el desarrollo de gametos masculinos previo a la producción simultánea de ambos sexos. Esta diferencia entre los tiempos de maduración sexual entre ambos gametos, en el caso del hermafroditismo protándrico, favorecería al éxito reproductivo ante las condiciones ambientales en las que se encuentra una especie (Nakadera y Koene, 2013).

El surgimiento de los sexos permitió evolutivamente un mejor intercambio genético al mismo tiempo en que generó una alianza conflictiva en la cual cada individuo, sea en especies dioicas o hermafroditas, intenta mejorar su éxito en transmitir sus genes. Aunque la reproducción sexual se considera un proceso simétrico, en el sentido de que normalmente, dos individuos que se reproducen contribuyen igualmente al genoma de su descendencia, a menudo, es muy asimétrica en términos de inversión de recursos en los gametos (Hermann et al., 2009). En invertebrados, la inversión energética en gónada y en producción de gametos en el sexo femenino, en términos de biomasa, superan entre dos y cuatro veces a la producción en el sexo masculino (Hayward y Gillooly, 2011). En este sentido, los hermafroditas simultáneos representan un aumento considerable en la inversión energética, ya que producen concurrentemente ambos gametos (Heath, 1977). No obstante, Ghiselin (1969) señala que, en especies con baja movilidad y baja densidad, el hermafroditismo simultáneo se supone una condición ventajosa ya que a diferencia de las dioicas, todo el encuentro entre dos individuos hermafroditas simultáneos supone la posibilidad de apareamiento (Tomlinson, 1966; Ghiselin, 1969; Morgan, 1994; Anthes et al., 2010).

Con respecto a las estrategias reproductivas en hermafroditas simultáneos, estos dividen de manera óptima los recursos entre roles masculino y femenino, pudiendo resultar en comportamientos de apareamiento subordinados a la cercanía o al tamaño (talla) de los individuos, lo que a su vez podría originar conflictos sexuales entre potenciales parejas (Chaine y Angeloni, 2005). El conflicto se produciría en decidirse por aparearse exclusivamente en el rol sexual preferido, no permitiendo reciprocidad de roles, o intercambiar roles secuencialmente, apareándose en ambos (Pal et al., 2006). Hermafroditas simultáneos pueden aparearse en ambos roles sexuales al mismo tiempo, en caso de especies diáulicas, con orificios sexuales separados, o actuar en un rol sola o alternadamente (Pal et al., 2006). Charnov (1979) indica que los hermafroditas simultáneos suelen aparearse más para poder aportar su esperma que para recibir. Por lo tanto, es importante conocer primordialmente en que tallas se desarrolla la madurez sexual en una especie para entender junto a otros aspectos de su biología reproductiva, como se desenvuelven sus estrategias reproductivas en un determinado ambiente.

En moluscos, estudios de determinación de la talla de primera madurez sexual son frecuentes principalmente en especies marinas explotadas comercialmente, como gasterópodos, bivalvos y principalmente cefalópodos, aportando datos que regulen rangos de tallas explotadas para una población (Rodhouse y Hatfield, 1992; Giménez y Penchazsadeh, 2003; Ilano et al., 2003; Cledón et al., 2008; Son y Chung, 2009; Averbuj et al., 2010; Torroglosa y Giménez, 2010; Chung et al., 2012; Avaca et al., 2017), y menos frecuentes en estudios de especies de importancia ecológica (Schmera et al., 2016; Torroglosa y Giménez, 2018). Sin embargo, no se encontraron publicaciones acerca de la talla de primera madurez sexual para especies hermafroditas de gasterópodos marinos, sea secuenciales o simultáneas, aunque dicha información es valiosa para comprensión de procesos ecológicos, fisiológicos y principalmente comportamentales de una especie (Chaine y Angeloni, 2005; Chapman, 2006; Nakadera et al., 2015).

El presente trabajo se propuso determinar la talla de primera maduración sexual para las porciones gonadales femeninas y masculinas presentes en la glándula hermafrodita de *S. lessonii* y constatar si hay diferencia en la talla de maduración encontrada para ambos.

## 3.2. Materiales y Métodos

### 3.2.1. Recolección de muestras e histología

Se examinaron 241 ejemplares recolectados aleatoriamente de la población de *S. lessonii* del muelle de Villa Gesell. Los individuos analizados corresponden a los meses comprendidos en el periodo reproductivo (octubre-febrero). En cada individuo se registró longitud total (LT) de la concha con un calibre Vernier ( $\pm 0,01$  mm) y se extrajo la gónada hermafrodita para luego fijarla en solución acuosa de Bouin. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas, incluidas en historesina y seccionadas a 5  $\mu$ m de espesor con el uso de un micrótopo Leica. Los preparados histológicos fueron luego coloreados con hematoxilina de Carazzi y eosina alcohólica.

### 4.2.2. Intervalos de talla de madurez sexual

Mediante la observación de los preparados histológicos se determinó la madurez de cada porción de la gónada hermafrodita. Fueron consideradas maduros los individuos con presencia de oocitos vitelogénicos maduros (ovm) para la porción femenina, y espermatozoides (esz), para la masculina. Se definieron intervalos de tallas de 1 mm desde los 4,00 mm hasta los 18,99 mm y se obtuvo el porcentaje de individuos maduros dentro de cada rango de talla para cada porción gonadal. Se estableció como indicativo de la talla de primera madurez sexual poblacional, al intervalo de talla donde el 50% de los individuos alcanzó la madurez para cada porción gonadal. El porcentaje (%) de la talla de primera madurez sexual se determinó como el número de individuos maduros  $\times 100$  / número total de individuos analizados histológicamente.

Para calcular la tasa (50%) de la talla de madurez sexual se ajustó la tasa de madurez sexual poblacional a una ecuación exponencial, y se estimó que la talla equivalente al tamaño al 50% de madurez sexual era la LT sexualmente madura de la población, según el método utilizado por Chung y Ryou (2000). La ecuación exponencial de la tasa de madurez sexual (Tabla 3.1) es la siguiente:  $TM = 100 / [1 + \exp(a-bx)]$ , donde, TM: tasa de madurez sexual; a, b: constantes, x: largo total de la concha.

## 3.3. Resultados

En juveniles de *S. lessonii* menores a 4 mm de LT no se diferenci3 la g3nada hermafrodita en ning3n ejemplar (Tabla 4.1). Estos individuos fueron clasificados como indeterminados en raz3n de la ausencia de ambos gametos sexuales. Adem3s, otra caracter3stica histol3gica en ellos es que la gl3ndula digestiva predomin3 en la regi3n posterior dorsal. Si bien se examinaron ejemplares de hasta 6,40 mm que fueron indeterminados, a partir de los 4,00 mm, se encontraron g3nadas en desarrollo con estadios tempranos espermatog3nicos, con acinos ampliamente ocupados en su porci3n distal por espermatogonias y espermatocitos; y en la porci3n proximal el epitelio acinal se advirti3 fl3cido con lumen libre y pocos gametos presentes (Figura 4.1A). Este estadio de inmadurez sexual indic3 el inicio de la gametog3nesis para la porci3n masculina de la g3nada hermafrodita previamente a la femenina. El individuo de menor talla al que se pudo determinar la presencia de oocitos pre-vitelog3nicos present3 longitud de 5,10 mm. En esta condici3n la frecuencia de gametos femeninos se observ3 baja con relaci3n a la masculina, con el desarrollo de un limitado n3mero oocitos pre-vitelog3nicos solitarios en las zonas distales del acino, adheridos a la pared del epitelio del mismo (Figura 4.1B).

Clase LT (mm)	Femenina			Masculina		
	Madurez	C3lculo	Dif.	Madurez	C3lculo	Dif.
4	0%	2%	0,000	0%	3%	0,001
5	0%	5%	0,003	0%	7%	0,005
6	19%	12%	0,004	25%	17%	0,007
7	27%	27%	0,000	32%	35%	0,001
8	48%	49%	0,000	62%	60%	0,000
9	69%	71%	0,000	75%	80%	0,003
10	86%	87%	0,000	96%	92%	0,002
11	100%	94%	0,003	100%	97%	0,001
12	100%	98%	0,000	100%	99%	0,000
13	100%	99%	0,000	100%	100%	0,000
14	100%	100%	0,000	100%	100%	0,000
15	100%	100%	0,000	100%	100%	0,000
16	100%	100%	0,000	100%	100%	0,000
17	100%	100%	0,000	100%	100%	0,000
18	100%	100%	0,000	100%	100%	0,000

Tabla 3.1. Distribuci3n de la frecuencia de madurez en *S. lessonii* entre los rangos de tallas estudiadas y el c3lculo para la ecuaci3n exponencial de la tasa de madurez sexual.

A partir del rango de 6,00 mm se observaron gametos maduros de ambos sexos en algunos pocos ejemplares, siendo la menor talla de un individuo de *S. lessonii* encontrado con oocitos vitelog3nicos maduros de 6.15 mm de LT (Figura 3.1C).

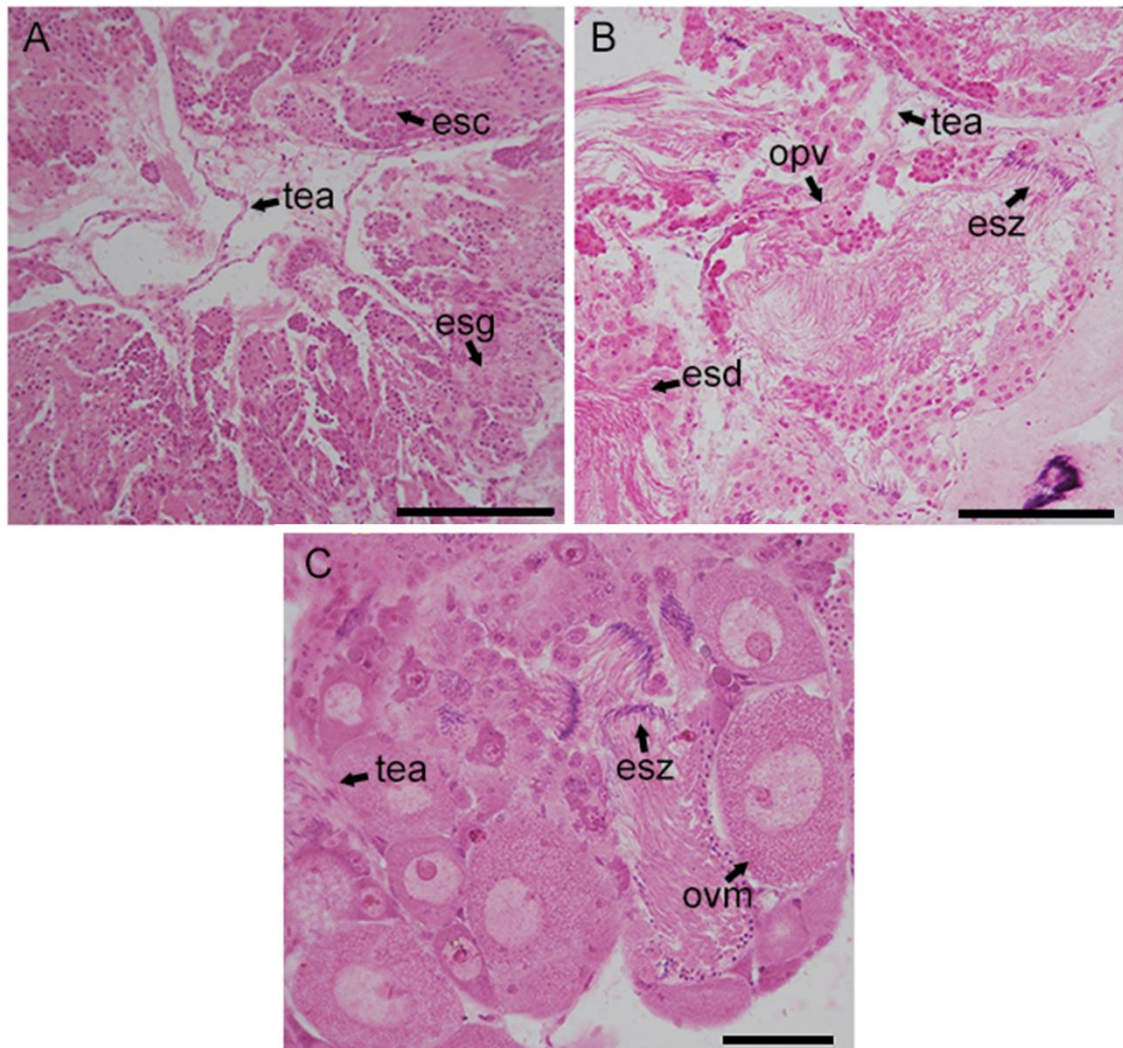


Figura 3.1. Criterios de clasificación para la determinación de la madurez sexual en *S. lessonii* en la población del muelle de Villa Gesell. **A.** Individuo inmaduro con estadios de desarrollo gametogénico temprano. **B.** Presencia estadios tempranos de la gametogénesis para la porción femenina y maduros para la masculina. **C.** Gametos maduros femeninos y masculinos compartiendo un mismo acino. Abreviatura: esc, espermatocito; esd, espermatida; esg, espermatogonia; esz, espermatozoide; opv, oocitos pre-vitelogénicos; ovm, oocitos vitelogénicos maduros; tea, tejido epitelial del acino. Escalas: 20  $\mu$ m.

### 3.3.1. Talla de primera madurez sexual

Con base en la distribución de individuos inmaduros y maduros en función de la madurez gonadal, en los rangos de talla de 1,00 mm, se calculó la talla correspondiente del tamaño (LT) al que el 50% de los individuos estudiados presentaron madurez sexual. De este modo se determinó que la talla de primera madurez sexual (TM 50%) de *S. lessonii* resultó ser de 7,6 mm para la porción masculina mientras que para la femenina 8,0 mm (Figura 3.2). A partir de los 11,00 mm todos los individuos analizados

presentaron ambas porciones gonadales maduras. Por lo tanto, estos resultados sugieren un periodo de protandria en la maduración sexual en *S. lessonii*, previo a la producción simultánea de gametos masculinos y femeninos.

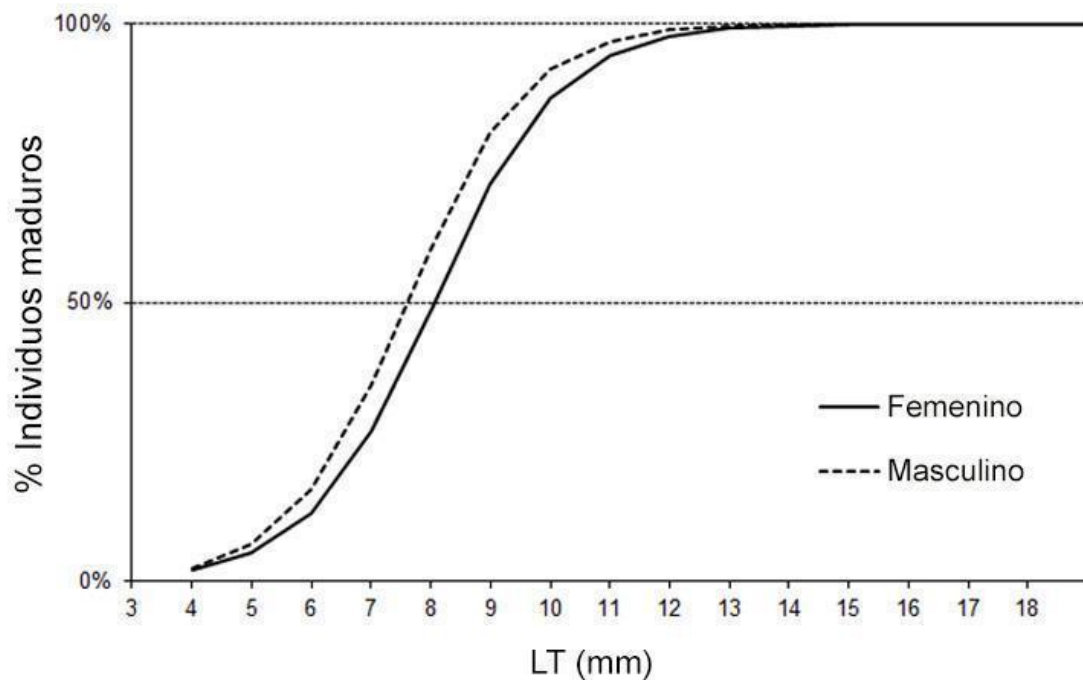


Figura 3.2. Talla de madurez gonadal para ambas porciones de la gónada hermafrodita en *S. lessonii*. Proporción de individuos inmaduros y maduros respecto de la longitud total LT (mm).

#### 4.4. Discusión

El presente estudio es la primera determinación de talla de primera madurez para una especie de la familia Siphonariidae. A partir de estas observaciones se definió la estrategia reproductiva de *S. lessonii* como hermafrodita de protandria simultáneo.

Los resultados encontrados señalan un periodo de protandria inicial en *S. lessonii* y coinciden con las observaciones realizadas para *S. hispida* (Marcus y Marcus, 1960) y para *S. pectinata* (Zischke, 1974). Pal y Hodgson (2005) también encontraron ese patrón para *S. capensis* con un breve periodo de protandria donde individuos de 9,00 mm de longitud presentaban gametos de la porción masculina de la glándula hermafrodita y ambos gametos a partir de los 10,00 mm. Marcus y Marcus (1960) advirtió la presencia de espermatozoides en el ducto hermafrodita de *S. hispida* en individuos a partir de 5,00 mm de longitud de concha, mientras que pequeños oocitos inmaduros fueron solo observados a partir de los 7,00 mm, no indicando la talla en que se observaron oocitos maduros. Estas observaciones indican que *S. hispida* produce espermatozoides en

individuos de menor talla, pero oocitos a mayores tallas que *S. lessonii*, resultando así en un intervalo más largo de tiempo de protandria para *S. hispida*.

Cabe destacar que *S. lessonii*, *S. hispida* y *S. capensis* presentan medidas máximas de concha ( $LT \leq 30,00$  mm) similares para las poblaciones estudiadas, pero en regiones de climas distintos. Sin embargo, tanto Marcus y Marcus (1960) como Zischke (1974) no determinaron la talla de primera madurez para las poblaciones investigadas. Además, Zischke (1974) ha determinado en *S. pectinata* que la mayoría de los ejemplares mayores de 20,00 mm de longitud se portaron como hembras funcionales, con presencia exclusiva de gametos femeninos en la gónada.

El presente estudio observa que *S. lessonii* madura sexualmente primero en el rol masculino antes que en ambos roles sexuales simultáneamente. Esta constatación permite inferir en su población en otro conflicto sexual (Leonard, 1990, 1991; Scharer et al., 2015). El conflicto sexual se define como el conflicto entre los intereses evolutivos de un donante de esperma y un receptor de esperma. En este caso, con respecto al cumplimiento exitoso de su estrategia reproductiva, visto que individuos de tallas exclusivas masculinas no podrían alternar su función sexual en el apareamiento. Pal et al. (2006) determinó que para los apareamientos observados en dos poblaciones de *S. capensis* en Sudáfrica hubo copulación no-recíproca, donde los individuos copulaban como donadores de gametos o como receptores, y además, la cópula ocurría con individuos de tallas similares y que se encontraban próximos. En los individuos jóvenes exclusivamente masculinos de *S. lessonii* este comportamiento podría representar una desventaja en el éxito de su apareamiento con respecto a individuos de mayores tallas, puesto que solo podrían desempeñar un rol sexual (masculino) y si a su vez, existe una preferencia de elección por tallas similares.



## Capítulo 4: Desarrollo embrionario y larval

### 4.1. Introducción

Todo ciclo de vida que comprenda dos fases distintas entre sí, una larva pelágica y un adulto bentónico, es originario de todos los metazoarios (Jägersten, 1972). En los invertebrados marinos las larvas conforman organismos funcionales con una forma particular de existencia dentro del ciclo de vida de una especie; incluyendo estadios morfológicamente distintos al estadio adulto y pudiendo habitar ambientes diferentes a este. El desarrollo de los primeros estadios del ciclo de vida corresponde a un periodo sensible en cualquier grupo de invertebrados, y su proceso está influenciado fundamentalmente por factores ambientales (Scheltema, 1966; Berry y Hunt, 1980; Thomas y McClintock, 1990; Pechenik et al., 2003; Sarker et al., 2007; Bashevkin y Pechenik, 2015; Kessel y Phillips, 2018; Slama et al., 2018). Además, la complejidad de la anatomía y de las estructuras que se desarrollan durante el periodo larval posee una relación intrínseca con la evolución, la ecología y el modo de vida de las especies (Thorson, 1946; Grahame y Branch, 1985; Jablonski, 1986; van den Biggelaar y Haszprunar, 1996; Ponder y Lindberg, 1997).

Euthyneura es un clado de gastrópodos heterobranquios que incluye los tradicionales taxones Opisthobranchia y Pulmonata (Haszprunar, 1985a, 1988), los cuales presentan gran diversidad morfológica y ecológica y por consiguiente una favorable disposición para el cambio evolutivo. El estudio ontogénico permite interpretar las variaciones genotípicas en las transformaciones que se observan en una determinada población. Por lo tanto, los cambios evolutivos en el desarrollo de una especie dependen de la interacción entre factores ecológicos (ej. disponibilidad de nicho) y las variantes fenotípicas de los individuos (Müller, 2007; Laland et al., 2015; Erwin, 2015, 2017). En este sentido, informaciones relativas a los ciclos de vida, la reproducción, el desarrollo y la biología larvaria, así como los factores que actúan, modelan y afectan el desarrollo de los organismos proporcionan datos importantes en el entendimiento de la historia evolutiva y de vida de una especie.

Durante el desarrollo embrionario los patrones del clivaje, la duración de cada estadio, el tipo de espiralización y relación de volumen entre los blastómeros están directamente relacionados a aspectos evolutivos que caracterizan diversos grupos de

invertebrados, especialmente a los gasterópodos (van den Biggelaar, 1993). En los organismos con clivaje espiral (Spiralia), que incluye los gasterópodos, los planos de clivaje no son paralelos o perpendiculares al eje animal-vegetal del huevo como ocurre en el clivaje radial, y sí en ángulos oblicuos, formando una disposición de blastómeros en "espiral". Como consecuencia, las células presentan mayor contacto entre sí que en los radiales, y esa disposición de blastómeros resulta termodinámicamente más estable. Así los embriones que se escinden en espiral usualmente experimentan menos divisiones antes de iniciar la gastrulación, lo que permite seguir el destino de cada célula de la blástula (Gilbert, 2000; Sarker et al., 2007).

La forma larvaria considerada como más primitiva recibe el nombre trocófora y comparte singularidades entre los diferentes grupos de invertebrados. Generalmente esa forma permanece en el interior del huevo y desarrolla el lóbulo pre-oral que da origen a la estructura del velo, la cual es una estructura ciliada y lobular (Chambers y McQuaid, 1994b). A ese segundo estadio larval que presenta velo, típico en los moluscos, se la conoce como larva veliger y esta finalmente eclosiona de su ovicápsula y se libera al medio. La larva veliger, es de vida libre, presenta algunos de los órganos del futuro organismo adulto: la presencia del pie rudimental, el manto que cubre toda su superficie dorsal, una concha larvaria o protoconcha que recubre el manto y que se elabora a partir de secreciones glandulares de la envoltura, y finalmente dos o varios lóbulos amplios provistos de diminutos cilios móviles que permiten el desplazamiento de la larva y además filtran y conducen partículas alimentarias suspendidas en el agua hasta la boca larval (Chambers, 1994).

La veliger libre es generalmente una larva planctotrófica que se alimenta de organismos que componen el fitoplancton hasta completar su asentamiento (Jägersten, 1972; Jablonski y Lutz, 1983; Nielsen, 1985; Strathmann, 1987). Ambas formas larvarias están adaptadas para la vida acuática y se encuentran en todas las especies de moluscos marinos pero faltan en las especies terrestres y en casi la totalidad de las especies de agua dulce (Hazsprunar et al., 1995). En moluscos, el modo de alimentación de la veliger por su parte se refleja en la morfología y la estructura de la protoconcha larval (Hazsprunar et al., 1995).

La temperatura es un regulador de la velocidad de procesos bioquímicos fundamentales, incluyendo la velocidad de desarrollo y la supervivencia de los organismos, principalmente en los ectodérmicos. En gasterópodos, diversos estudios han observado que el ritmo de las primeras segmentaciones, dentro de ciertos límites, presenta

relación directa con la temperatura del agua (Costello et al., 1957; Scheltema, 1967; Thomas y McClintock, 1990; Slama et al., 2018). También, la temperatura influye en la variación del desarrollo, el tiempo transcurrido hasta que ocurre la eclosión y la longevidad o supervivencia de las larvas en una especie, así como entre especies (Scheltema, 1967; Lucas y Costlow, 1979; Lima y Pechenik, 1985; Thomas y McClintock, 1990; Pechenik, 2003; Przeslawski, 2004; O'Connor et al., 2007; Wang et al., 2017). Por otro lado, la regla de Thorson a su vez explica la disminución ecogeográfica de la proporción de especies marinas de desarrollo larval planctónico en función del aumento del gradiente latitudinal.

*S. lessonii*, así como los demás sifonáridos, deposita sobre los sedimentos consolidados de los pisos supra y mediolitoral, entre macrófitas y sobre parches de mejillines (observación del autor) masas translúcidas que contienen en su interior un gran número de embriones que se desarrollan dentro de ovicápsulas enlazadas en cadena e inmersas en una matriz gelatinosa (Olivier y Penchaszadeh, 1968; Pechenik, 1979; Chambers y McQuaid, 1994a,b; Hodgson, 1999; Pal y Hodgson, 2005). En la familia Siphonariidae, el desarrollo larval puede darse tanto de forma directa, con la eclosión de un organismo juvenil completamente metamorfoseado, como de forma indirecta, donde generalmente una forma larvaria planctónica eclosiona y posteriormente completa su desarrollo en la columna de agua derivando junto a corrientes marinas lejos de su lugar de desove (Thorson, 1950). Con la segunda modalidad se produce una dispersión o propagación de la especie que tiende a expandir su ocupación a áreas geográficas adyacentes, así como posibilita también el flujo genético entre poblaciones (Grantham et al., 2003). Es por ello que información acerca del modo los tiempos del desarrollo larval relacionados a parámetros ambientales aportan al entendimiento de los patrones de distribución y consecuentemente de la dinámica de las comunidades (Todd, 1998; Swearer et al., 1999).

El objetivo de este capítulo es describir el desarrollo embrionario y larval de *Siphonaria lessonii* a nivel morfológico y estructural, y relacionarlo a aspectos evolutivos en Gastropoda y el modo de vida de esta especie. Además, analizar el desarrollo embrionario y larval en dos rangos de temperatura.

## 4.2. Materiales y Métodos

### 4.2.1. Recolección y mantenimiento en acuario

Cincuenta especímenes adultos con una longitud de concha entre 12,00 -16,60 mm se recolectaron manualmente en los pilotes del muelle de Villa Gesell, en agosto del 2016. Las muestras fueron transportadas vivas en contenedores al laboratorio. El estudio se desarrolló en el periodo de agosto a diciembre de 2016. Los ejemplares fueron dispuestos en dos acuarios de 12000 cc cada uno, se acondicionaron con rocas recogidas en la costa y pequeños parches de mejillines *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1842) del mismo sitio de muestreo que se dispusieron en el fondo de los acuarios para proporcionar un sustrato natural y con 6 litros de agua de mar del sitio de muestreo. Se mantuvieron en condiciones de control de temperatura y salinidad a  $12 (\pm 2) ^\circ\text{C}$  y  $34 (\pm 4)$  psu, respectivamente, y expuestos a fotoperiodo de 12/12h. El agua de mar fue aireada continuamente utilizando una bomba de aireación y fue renovada parcialmente (en un 25%) cada tres días con agua elaborada con una composición de agua destilada y sal marina comercial así como de agua de mar (sin filtrar ni esterilizar).

La alimentación para los individuos se proporcionó a través de biofilms de algas naturales que se produjeron naturalmente en las paredes de vidrio del acuario previamente a los experimentos, además del contenido de algas presentes en el agua recolectado.

### 4.2.2. Desove de masas ovígeras

El desove de masas ovígeras fue estudiado en un periodo de 35 días consecutivos a través del monitoreo diario de los acuarios cada 2 horas durante todo el período lumínico. Las masas ovígeras (MO) depositadas fuera del periodo de monitoreo no fueron consideradas para el acompañamiento del desarrollo embrionario. Durante el experimento se obtuvieron un total de 41 masas ovígeras. Durante los periodos de monitoreo diario, hubo una ocurrencia de 17 puestas. De las restantes 24 masas ovígeras depositadas en periodos no monitoreados se utilizaron solamente sus medidas (largo, ancho y alto) para este estudio. Se registraron fecha, hora y tiempo de desove, y se midió el largo y el ancho de las MO con un calibre Vernier ( $\pm 0,01$  mm). El número total de embriones por MO fue cuantificado dividiendo cada una de estas en 4 secciones a través de dos ejes, uno transversal y uno longitudinal (Figura 4.1). Se estimó el número promedio de embriones en una de estas secciones y luego se extrapolo para las demás.

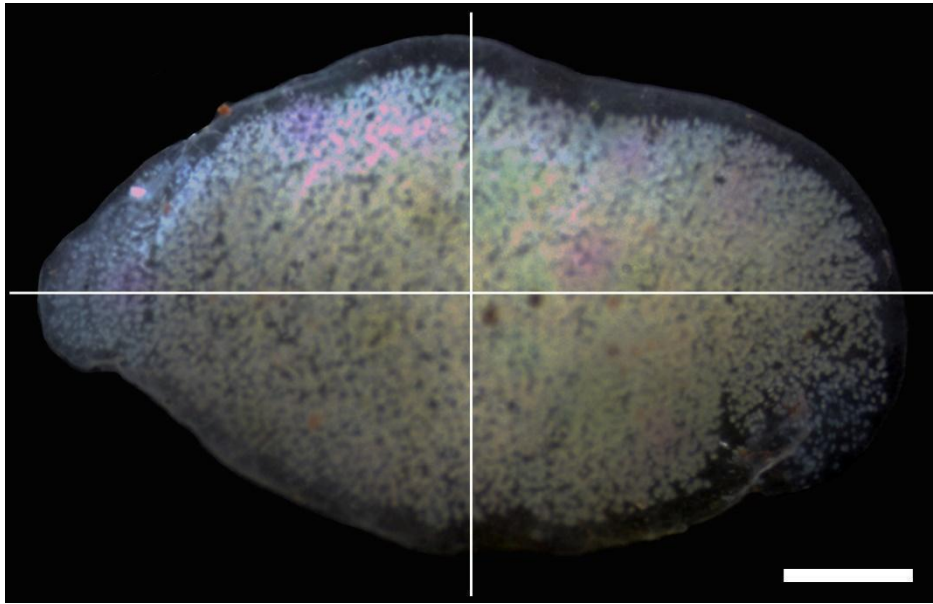


Figura 4.1. Masa ovígera con embriones en su interior de *Siphonaria lessonii*. Las líneas blancas señalan las secciones transversal y longitudinal. Escala: 0,2 cm.

### 5.2.3. Desarrollo embrionario y larval

Para el seguimiento e interpretación morfológica del desarrollo embrionario y larval de *S. lessonii* se realizaron observaciones in vivo en microscopía óptica. Las masas ovígeras depositadas en los acuarios durante los periodos de monitoreo fueron transferidas individualmente a contenedores de 50 ml con agua salada en aireación constante. El agua de los contenedores a diario se renovaba parcialmente con agua filtrada de los acuarios mediante una membrana Milipore de 1  $\mu\text{m}$ . Previo a la eclosión de las larvas veliger, las masas se transfirieron a contenedores de 100 ml de vasos de precipitados donde el agua utilizada no fue filtrada para suministrar una fuente de alimento a las larvas a través de microalgas.

El desarrollo de los primeros estadios de vida de *S. lessonii* fue estudiado en dos rangos distintos de temperatura: 12 °C ( $\pm 2$  °C) y 20 °C ( $\pm 2$  °C). Los embriones se observaron vivos bajo microscopio óptico (Zeiss Axiostar) y su desarrollo se registró fotográficamente con una cámara Canon (Canon G10). Los estadios del desarrollo fueron determinados en base a características morfológicas y anatómicas, denominándose; 1 célula, 2 célula, 4 célula, mórula, blástula, gástrula, trocófora, veliger intracapsular y veliger libre. Las protoconchas del estadio embrionario y larval se clasificaron en protoconcha tipo I y II, respectivamente. Durante las primeras 12 horas pos-desove, se examinaron los embriones en las masas ovígeras en intervalos de 2 horas. En el segundo

día, las observaciones se hicieron cada 6 horas y posteriormente, cada 24 horas. De este modo se registraron los tiempos de desarrollo para cada estadio. También se caracterizó el desarrollo a través de mediciones realizadas en los embriones, así como en las ovicápsulas ovígeras en cada estadio, utilizándose el software AxioVision (2013) 4.8.2. Las ovicápsulas fueron medidas en su eje mayor y menor y ambas mediciones se utilizaron para calcular el diámetro promedio de la ovicápsula ( $dp_o$ ). Los estadios de desarrollo embrionarios (desde 1 célula hasta– trocófora también se midieron y se calcularon de la misma forma, diámetro promedio del embrión ( $dp_e$ ). Los estadios de mórula y blástula no pudieron ser diferenciados en los registros fotográficos por lo cual sus medidas fueron tomadas como un único estadio. En los estadios de larva veliger se midió solamente el largo total ( $\mu m$ ) de la protoconcha.

Con el fin de estudiar la organogénesis larval, larvas veliger tanto intracapsulares como libres nadantes fueron narcotizadas en solución de cloruro de magnesio isotónica disuelta en agua de mar según Enriquez-Diaz et al. (2015) para mejor descripción de las estructuras y fotografía. Una vez relajadas, una proporción de larvas veliger fueron fijadas en 4% formaldehído en agua de mar y otra en 2,5% glutaraldehído en tampón fosfato durante 24h a 4 °C. Luego, las fijadas en glutaraldehído fueron aclaradas dos veces en solución tampón para enseguida ser lavadas en agua destilada. Finalmente, las muestras se deshidrataron en una serie de soluciones ascendentes de alcohol hasta 100% y aquellas fijadas con 4% formaldehído en agua de mar fueron incluidas en parafina, mientras que las fijadas en 2,5% glutaraldehído se incluyeron en resina. Las inclusiones fueron cortadas en micrótopo y coloreados en solución hematoxilina y eosina.

#### **5.2.4. Análisis estadístico**

El número de embriones y la relación con el largo de la masa ovígera se analizó mediante una regresión lineal.

El tiempo transcurrido desde la oviposición, el periodo de duración, el diámetro promedio de cada estadio de desarrollo embrionario y larval ( $dpe$ ) y el diámetro de las ovicápsulas ( $dpo$ ) expuestos a diferentes temperaturas (12°C y 20°C) fueron comparadas a través de la prueba t (Sokal y Rohlf, 1995) o mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, cuando los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) no se cumplieron y la transformación de datos no fue posible.

Con el fin de comparar el crecimiento diario de las larvas expuestas a las dos temperaturas se analizó a través del análisis de ANOVA de un factor. El crecimiento de las larvas se analizó hasta el 12° día debido a que hasta esta fecha se obtuvo un número de mediciones considerable para dicho análisis en ambas temperaturas. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistical Statsoft 7.1.

### **5.2.5. Morfología de la protoconcha**

La descripción morfológica de la protoconcha se hizo con el uso de microscopía óptica y, para lograr mayor detalle de su microestructura, larvas veliger con protoconchas en distintos estadios de desarrollo fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido (M.E.B.). Protoconchas en distintos estadios del desarrollo fueron preparadas para observación. Para M.E.B., posteriormente a la fijación en 2,5% glutaraldehído y remoción de tejidos blandos con uso de solución de hipoclorito de sodio y agua destilada (1:3), las muestras se introdujeron en acetona al 100% para enseguida realizarse el punto crítico introduciendo CO<sub>2</sub> líquido que gradualmente reemplazó la acetona. Las protoconchas se montaron sobre soportes de aluminio recubiertos con cinta pegajosa doble faz. Las muestras fueron recubiertas con oro-paladio (en un metalizador Termo VG Scientific SC7620) y examinadas en un microscopio Philips modelo XL30 TMP New Look. Las imágenes fueron obtenidas y analizadas con el software ANALYSIS.

## **5.3. Resultados**

### **5.3.1. Desove y masa ovígera in vitro**

Los individuos de *S. lessonii* depositaron sus masas ovígeras en las paredes y sobre las rocas de los acuarios en niveles cercanos a la superficie del agua. El primer desove fue observado en el quinto día posterior al inicio del periodo de aclimatación de los especímenes recolectados en los acuarios y a partir de esa fecha se siguieron oviposiciones casi diariamente con baja variación en frecuencia (Figura 4.2). La frecuencia de oviposición fue dispersa en los 35 días de observación, se hallaron en total 41 puestas donde la mayor frecuencia se observó en dos periodos, entre 1° y 2 de septiembre con 6 oviposiciones entre ambos días (14,63%), y entre el 14 y 15 del mismo mes, con 5 (12,20%). Los desoves ocurrieron con mayor frecuencia durante la noche (24 puestas; 58,54%) y en la mañana en las primeras 6 horas del fotoperiodo (12 puestas; 28,27%).



El tiempo del proceso de desove se observó entre 60 y 180 minutos, en lo cual los individuos en general realizaron un movimiento de elevación de la parte anterior del cuerpo con auxilio del pie (Figura 4.3A) donde desde el lado derecho, posición del orificio genital en la parte anterior, se evacuaron las masas ovígeras. En ese mismo movimiento, los individuos retrocedieron sobre su propia posición depositando la masa ovígera que se quedó adherida sobre el sustrato. Ese mismo comportamiento se vio tanto en deposiciones en la pared del acuario, donde el individuo retrocedía siempre hacía la parte más alta del acuario, como sobre las rocas dispuestas en el mismo. Ningún individuo fue observado desovando sumergido, aunque algunas puestas recolectadas en periodos no monitoreados se encontraran en el agua junto al fondo del acuario.

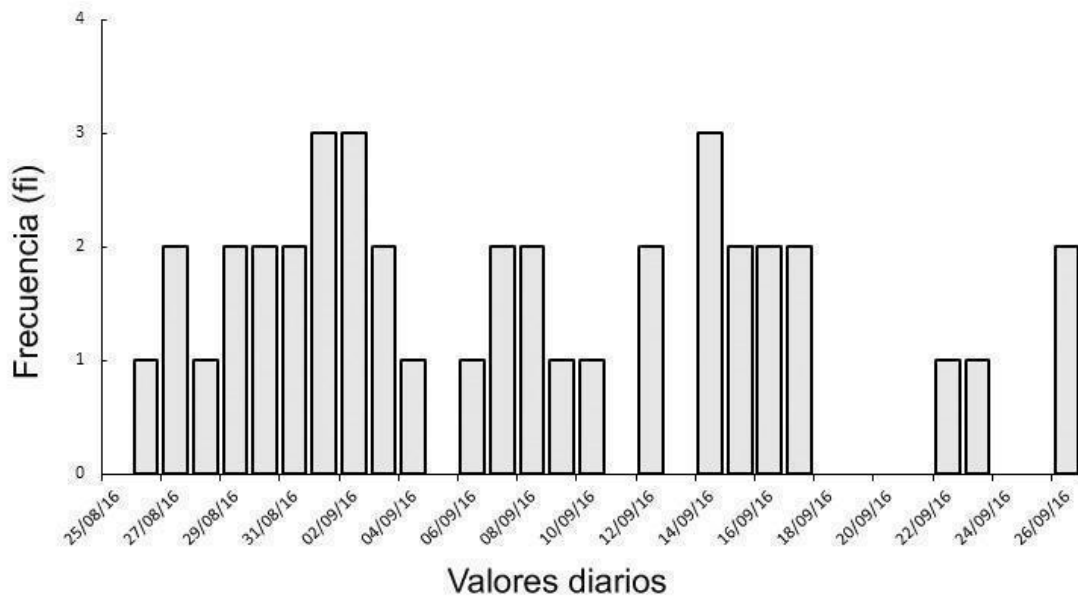


Figura 4.2. Frecuencia diaria de desoves de *S. lessonii* en agosto/septiembre del 2016.

Las puestas recién depositadas presentaron color beige claro casi transparente que progresaron con su desarrollo a tonos de amarillo claro (Figura 4.3B). El formato varió entre formas globulares o de bastones, algunas veces dispuestos en forma de media luna, pero mayoritariamente cilíndricas. Las medidas de largo y ancho obtenidas de las masas ovígeras variaron entre 6,07 y 12,98 mm ( $9,13 \pm 1,60$ ) y entre 5,54 y 9,21 mm ( $7,25 \pm 0,86$ ) respectivamente, y 2,5 y 3,7 mm de alto.

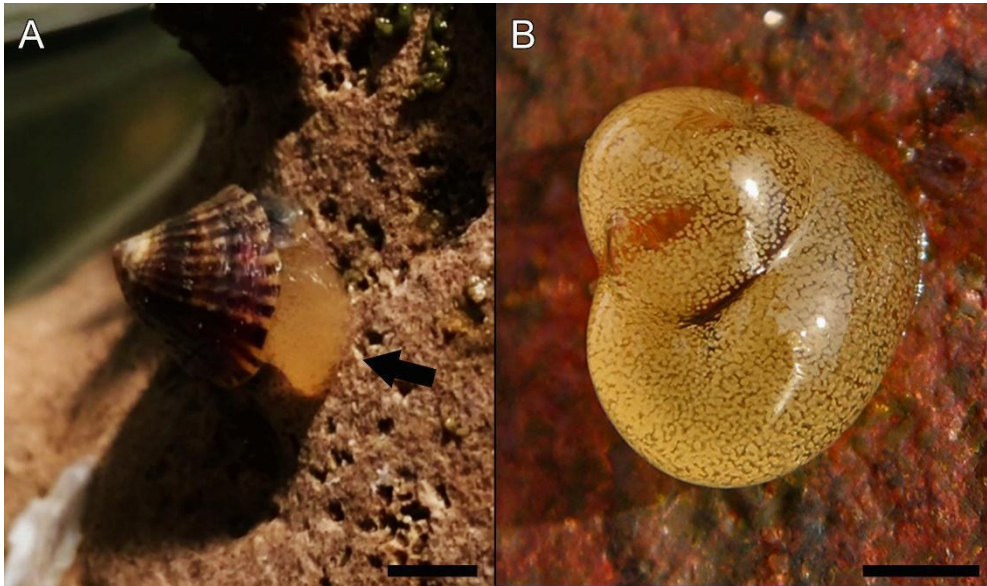


Figura 4.3. **A.** Ejemplar de *S. lessonii* desovando sobre estrato en acuario. **B.** Masa ovígera recientemente depositada. Escalas: 0,2 cm.

Las puestas contuvieron entre 1.156 y 21.308 unidades de cápsulas ovígeras ( $12455,76 \pm 6669,83$ ) de paredes delgadas y translúcidas y formato ovoide, conectadas en serie por un fino ligamento, semejante a chalaza, continuo al propio material de la ovicápsula.

En el interior de la cápsula, el embrión se observó en posición central e inmerso en una matriz gelatinosa constituida de un material perivitelínico de aspecto viscoso y granular que con los primeros clivajes se volvió completamente homogéneo. En general, cada ovicápsula contenía un único embrión (Figura 4.5A) aunque se registraron casos de dos embriones por cápsula (Figura 4.5B), algunos desiguales en dimensión, exiguos casos de cápsulas sin embriones (Figura 4.5C), mayoritariamente encontrados al final o principio de la cadena, y ovicápsulas con huevos no fertilizados, los cuales no presentaron una posterior segmentación. La regresión lineal entre el número de embriones y el largo de la masa ovígera fue significativa ( $r = 0,855$ ;  $p < 0,05$ )

### 5.3.2. Desarrollo embrionario y larval

La descripción del desarrollo embrionario y larval de *S. lessonii* se realizó a partir de observaciones de muestras vivas en microscopia óptica, desde el cigoto hasta el desenvolvimiento de la larva veliger planctotrófica libre nadante, en condiciones de temperatura controlada en laboratorio. A partir de estas observaciones se hizo un seguimiento morfológico del desarrollo de determinadas estructuras embrionarias y

larvarias así como la descripción histológica de estas últimas. Con base en estas informaciones se elaboró un cuadro de caracterización de cada estadio, puntualizados en la Tabla 4.1)

Estadio	Descripción
1 célula	Cigoto esférico y extrusión de los corpúsculos polares.
2 células	Período comprendido entre primer y segundo clivaje celular.
4 células	Entre segundo y tercer clivaje (comprende embrión de 3 células).
Mórula	Esfera de células agrupadas (>16 células).
Blástula	Formación del blastocele (>32 células).
Gástrula	Organización de los blastómeros en ectodermo y endodermo.
Trocófora	Desarrollo del lóbulo preoral y del velo ciliado. Inicio movimiento rotatorio.
Veliger intracapsular	Desarrollo del pie, opérculo, velo bilobulado, estatocistos y protoconcha.
Veliger libre	Post-eclosión, larva libre nadante planctotrófica.

Tabla 4.1. Descripción cronológica y caracterización morfológica de los estadios de desarrollo embrionario y larval de *S. lessonii* en el muelle de Villa Gesell.

En general, el desarrollo de los primeros estadios se observó levemente asincrónico entre embriones de una misma puesta, por lo cual se consideró el estadio correspondiente a de mayor concurrencia (>50%).

Analizando el tiempo transcurrido desde la oviposición de los estadios embrionarios y larvales en función de las temperaturas, fueron significativamente mayores los tiempos a los 12°C con respecto a los 20°C para los estadios de 2 células (Mann-Whitney; U = 10, p = 0,002), 4 células (Mann-Whitney; U = 4, p = 0,001), veliger intracapsular (Mann-Whitney; U = 20, p = 0,026) y veliger libre (Mann-Whitney; U = 1,5, p = 0,001). Mientras que mórula/blástula (Mann-Whitney; U = 18, p = 0,097), gástrula (Mann-Whitney; U = 32,5, p = 0,807), trocófora (Mann-Whitney; U = 30, p = 0,625) no difirieron significativamente entre temperaturas. En cuanto al periodo de duración de cada estadio se hallaron diferencias significativas entre temperaturas para 1 célula (Mann-Whitney; U = 1, p = 0,001) 2 células (Mann-Whitney; U = 4, p = 0,002), y veliger intracapsular (Mann-Whitney; U = 1,5, p = 0,001) siendo los periodos de desarrollo más largos a 12°C con respecto a 20°C. Para los estadios de 4 células, mórula/blástula, gástrula, trocófora y la longevidad de las larvas veliger libres no se encontraron diferencias significativas (Mann-Whitney; U = 18, p = 0,097; U = 32,5, p

=0,367; U = 30, p =0,626; U = 20, p =0,143; Student-t test,  $t = -1,133$ , p = 0,275, respectivamente) (Tabla 4.2).

En cuanto al crecimiento del embrión, las comparaciones entre estadios de desarrollo con relación a temperatura presentaron diferencias significativas solamente en el estadio de 2 células (Mann-Whitney; U = 79, p = 0,0001) donde se observó mayor crecimiento a 20° ( $95,78 \pm 4,90 \mu\text{m}$ ) que a 12° ( $90,21 \pm 3,20 \mu\text{m}$ ), y en el estadio de gástrula se encontraron diferencias significativas para el promedio de los diámetros de las ovcápsulas (Student-t test,  $t = -2,52$ , p < 0,016), siendo a 20°C de un diámetro promedio de  $168,56 \pm 3,26 \mu\text{m}$  y a 12°C de  $166,48 \pm 3,67 \mu\text{m}$  (Tabla 4.2).

Estadio embrionario y larval	Tiempo (h)		Periodo (h)		dpo ( $\mu\text{m}$ )		dpe ( $\mu\text{m}$ )	
	12°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	12°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	12°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	12°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )
<b>1 célula</b>	-	-	9,43 $\pm$ 0,90*	4,80 $\pm$ 1,33*	162,67 $\pm$ 6,49	164,55 $\pm$ 5,27	85,88 $\pm$ 4,42	84,85 $\pm$ 4,81
<b>2 células</b>	11,43 $\pm$ 0,90*	6,80 $\pm$ 1,33*	7,43 $\pm$ 2,06*	3,00 $\pm$ 1,61*	162,68 $\pm$ 6,27	163,62 $\pm$ 7,36	95,78 $\pm$ 4,90*	90,21 $\pm$ 3,20*
<b>4 células</b>	18,86 $\pm$ 2,10*	9,80 $\pm$ 1,66*	32,57 $\pm$ 6,30	21,00 $\pm$ 9,89	165,81 $\pm$ 8,27	166,36 $\pm$ 10,49	96,68 $\pm$ 4,80	96,41 $\pm$ 4,09
<b>Mórula/ Blástula</b>	51,43 $\pm$ 8,40	30,80 $\pm$ 11,32	48,00 $\pm$ 12,83	48,40 $\pm$ 12,83	164,19 $\pm$ 8,90	165 $\pm$ 98 $\pm$ 8,74	98,56 $\pm$ 4,70	97,01 $\pm$ 3,74
<b>Gástrula</b>	99,43 $\pm$ 8,40	79,20 $\pm$ 11,00	44,57 $\pm$ 8,4	48,00	166,48 $\pm$ 3,67*	168,56 $\pm$ 3,26*	98,62 $\pm$ 4,76	97,01 $\pm$ 3,74
<b>Larva trocófora</b>	144 $\pm$ 11,88	127,20 $\pm$ 11,00	58,29 $\pm$ 11,89	48,00	168,54 $\pm$ 4,65	169,78 $\pm$ 4,38	98,72 $\pm$ 3,75	99,42 $\pm$ 3,60
<b>Larva veliger intracapsular</b>	202,29 $\pm$ 11,88*	175,02 $\pm$ 11,00*	96 $\pm$ 12,83*	55,11 $\pm$ 11,00*	166,35 $\pm$ 6,00	166,50 $\pm$ 6,75	105,53 $\pm$ 12,35	107,96 $\pm$ 10,93
<b>Larva veliger libre</b>	298,29 $\pm$ 11,80*	230,40 $\pm$ 11,76*	195,43 $\pm$ 73,05	161,00 $\pm$ 44,36	-	-	139,89 $\pm$ 9,69	138,40 $\pm$ 10,80

Tabla 4.2. Características del desarrollo de los estadios embrionario y larval de *S. lessonii* en dos rangos de temperatura, 12° C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) y 20 ° C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ): tiempo transcurrido desde la ovoposición (horas); periodo de duración de cada estadio (horas); diámetro promedio de la ovicápsula (dpo) y diámetro promedio del embrión o la larva (dpe). Los asteriscos marcan diferencias significativas para cada estadio embrionario y larval entre temperaturas.

El crecimiento diario larval se comparó entre ambas temperaturas (Figura 4.4). El crecimiento fue acompañado diariamente hasta el 12° día del desarrollo en todas las puestas observadas. Las tallas de crecimiento fueron significativamente mayores entre el 3° y 10° día del desarrollo para la temperatura de 20°C, donde las diferencias superiores se observaron en el 3° ( $F=33,40$ ;  $p < 0,0001$ ), 5° ( $F=68,45$ ;  $p < 0,0001$ ) y 7° días ( $F=33,58$ ;  $p < 0,0001$ ). Cabe destacar que se observó una inversión de los valores en 12° día cuando la talla de crecimiento pasa a ser mayor a temperatura de 12°C aunque no se observaron diferencias significativas ( $F=3,50$ ;  $p = 0,068$ ). Además, la aparición de las larvas veliger en ambas temperaturas se observaron en tiempos diferentes (Figura 4, flechas) el tiempo de desarrollo hasta la eclosión de la larva veliger libre entre los rangos de temperatura estudiadas fue menor a los 20° C (9-10 días) que a los 12° C (12-13 días) conforme a lo presentado en figura 4. A 12°C las tallas de dicha larva fueron en aumento continuo, mientras que para las larvas veliger a 20°C se observó que su talla presentó tamaños similares desde el momento de su aparición.

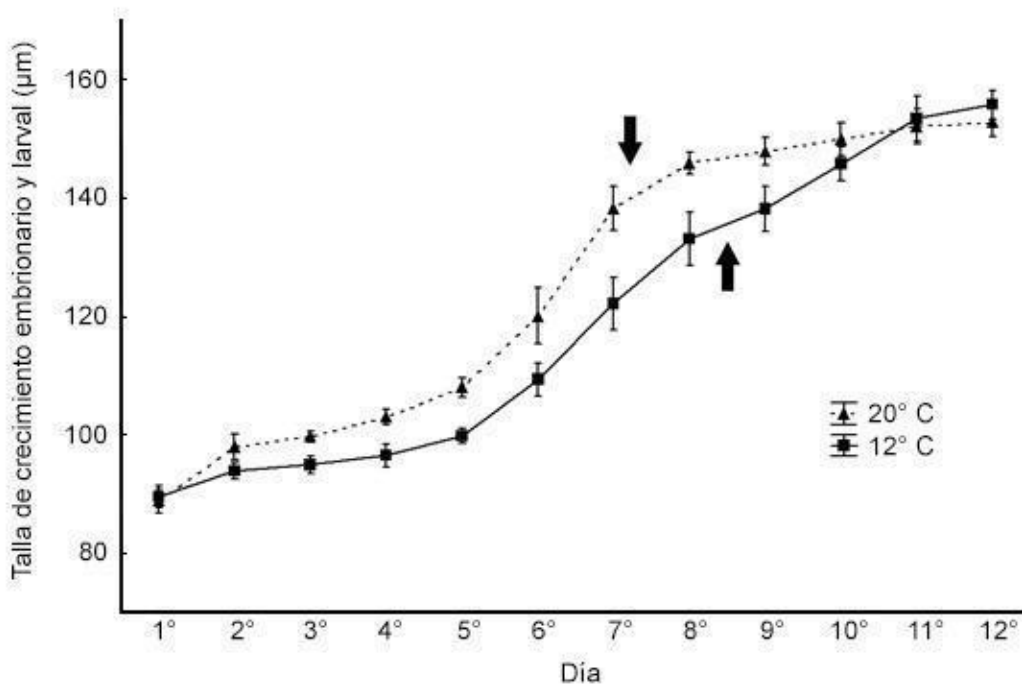


Figura 4.4. Talla de crecimiento acumulativo diario embrionario y larval de *S. lessonii* ( $\mu\text{m}$ ) (media  $\pm$  DE) en dos rangos de temperatura 12°C y 20°C. Las flechas indican inicio etapa de larva veliger en ambos rangos.

### 5.3.3 Caracterización ontogénica y morfológica del desarrollo embrionario y larval

Con respecto a la caracterización ontogénica y morfológica del desarrollo, la segmentación fue de tipo total (holoblástica) y espiral. Previo a la primera segmentación y extrusión de los corpúsculos polares se observó un cigoto y posterior a la segunda segmentación fueron observados cuatro blastómeros de igual tamaño (Figura 4.5A, B y D). El cigoto presenta forma esférica con  $dp_e$  de  $85,53 \pm 4,23 \mu\text{m}$  y un núcleo que se tornó conspicuo con la emisión en secuencia y sobrepuestos de los dos corpúsculos polares en el polo animal, lo que transcurrió dentro de las dos primeras horas pos-desove (Figura 4.5D). Se observaron que las dos primeras segmentaciones celulares fueron meridionales y equivalentes: la primera iniciándose desde el polo animal del cigoto (Figura 4.5E) y dividiéndose en dos células (Figura 4.5F). Estas dos segmentaciones ocurrieron respectivamente alrededor de las 12 y 19 horas a  $12^\circ\text{C}$ , mientras que, a  $20^\circ\text{C}$ , a las 7 y 10 horas. La asincronía en las segundas segmentaciones a temperatura de  $12^\circ\text{C}$  (Figura 4.5G) fue escasa. En el estadio de 4 células, el embrión alcanzó  $dp_e$  de  $97,91 \mu\text{m}$  ( $\pm 4,38$ ) y se verificó una disposición en forma de un par de blastómeros opuestos (Figura 4.5B y D) están en contacto entre sí en la zona del polo vegetativo, mientras que, ocurre lo mismo con un par opuestos (Figura 4.5A y C) en el polo animal (Figura 4.5H). Con la ubicación de la posición de los corpúsculos polares se pudo determinar los ejes del desarrollo antero-posterior y dorso-ventral (Figura 4.5I) del embrión en ese estadio.

En la tercera segmentación, se formaron sincrónicamente cuatro micrómeros (división desigual) resultantes de la división de cada uno de los 4 macrómeros preexistentes y que se observaron sobre estos últimos dislocados unos  $45^\circ$  de forma oblicua y en sentido horario sobre el eje mitótico en relación con el eje de los macrómeros. A partir de este punto, las segmentaciones ocurrieron regularmente en intervalos de alrededor de 2 h de forma aparentemente asincrónica entre micrómeros hasta el estadio de mórula, con 32 células (Figura 4.5J). Cada ciclo de segmentaciones siguientes proporcionó como resultado un conjunto de micrómeros adicionales sobre el anterior. Como resultado las células en el embrión en división aparecieron dispuestas en formato espiral, observándose desde el polo animal. En el segundo día del desarrollo, se observó la organización del embrión ( $dp_e$ :  $98,03 \pm 4,11 \mu\text{m}$ ) en blástula, aunque no se pudo distinguir la formación del blastocele (Figura 4.5K).

En el 3° día, el embrión alcanzó medidas de  $dp_e$ :  $98,55 \pm 3,69 \mu\text{m}$  y se evidenció la formación de las capas celulares que constituyen el endodermo y el ectodermo, cuando por invaginación se produjo la conformación de la gástrula (Figura 4.5L). Al día siguiente se observó la formación inicialmente de parches ciliares que enseguida dieron lugar a la



organización de una banda ciliada epidermal (prototroca) sobre el polo animal del embrión. Con el surgimiento y elongación de las ciliias, entre la etapa de gástrula a la formación de la larva trocófora, se observaron los primeros movimientos de rotación del embrión sobre su propio eje, dentro de la ovicápsulas. En ese estadio, el embrión presentó una clara transformación de su morfología esférica a una en forma más alargada y con una terminación globosa hacia el extremo anterior forma más alargada y con una terminación globosa hacia el extremo posterior-anterior, con la distinción de dos hemisferios uno en el polo animal, otro en el vegetal, caracterizando la formación de una típica larva trocófora ( $dp_e: 98,92 \pm 3,55 \mu m$ ) en el 5° día de desarrollo (Figura 4.5M).

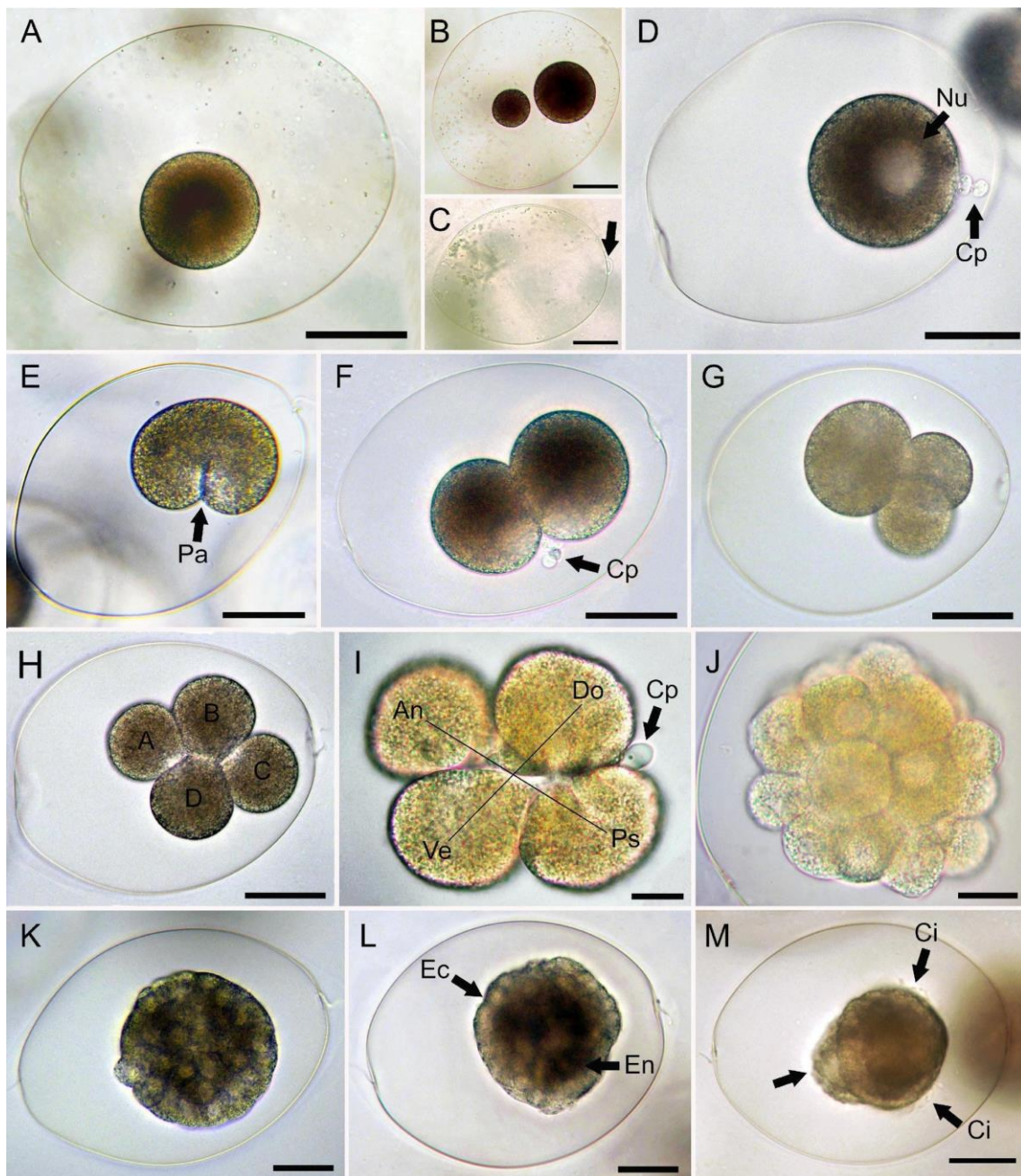


Figura 4.5. Estadios del desarrollo embrionario de *S. lessonii*, desde la oviposición hasta la organización de la larva trocófora. **A.** Cigoto previo a la primera segmentación y extrusión de los corpúsculos polares. **B.** cápsula ovígera con presencia de dos embriones. **C.** Cápsula ovígera sin embrión. Se observa el polo animal (flecha). **D.** Corpúsculos polares en el polo animal de la célula y núcleo evidente. **E.** Principio de la primera segmentación. **F.** Estadio de 2 células. **G.** División en 3 células, proceso asincrónico en el segundo clivaje celular. **H.** Estadio de 4 células dispuestas en dos pares de blastómeros. **I.** Estadio 4 células con ejes de desarrollo antero-posterior y ventral-dorsal. **J.** Estadio de mórula (>16 células.). **K.** Fase de blástula, organización celular en esfera. **L.** Gástrula, formación triblástica, ectodermo y endodermo. **M.** Larva trocófora, banda ciliar, detalle hemisferio polo vegetativo. Abreviaturas: An, anterior; Ci, cilias; Cp, corpúsculos polares; Ec, ectodermo; En, endodermo; Do, dorsal; Nu, núcleo; Pa, polo animal; Ps, posterior; Ve, ventral. Escalas: 50  $\mu\text{m}$ .

En el paso de larva trocófora a veliger (Figura 4.6A), entre el 5° y 6° día del desarrollo, se observó el inicio del proceso de plegamiento del embrión en la zona ventral y la división de la banda ciliar en dos lóbulos que se extendieron lateralmente. A partir de este punto, fue posible distinguir objetivamente en la veliger dos regiones: el cefalospodio, anteriormente, y la masa visceropialial, posteriormente. En su desarrollo intracapsular, la veliger presentó una longitud de  $106,32 \pm 9,68 \mu\text{m}$ . Los lóbulos del velo presentaron dos series o grupos ciliares distintos con origen en el borde lobular: uno largo ( $\pm 48 \mu\text{m}$ ) dispuesto internamente con movimientos hacia la boca larval, y otro más corto ( $\pm 40 \mu\text{m}$ ) dispuesto externamente con movimientos laterales. Ambos grupos ciliares siguieron desarrollándose pos eclosión, con un incremento mayor observado en las cilias externas. Se advirtió la deposición por secreción en forma de láminas con bordes visiblemente distinguibles de una fina cubierta homogénea, transparente, de superficie irregular sobre el manto larval. Además, se distinguió el espesamiento de esas láminas que dio lugar a la formación de la protoconcha embrionaria (tipo I), encerrando tejidos internos de la masa visceropialial en la porción posterior del embrión. En la porción anterior y ventral a los lóbulos ciliares de la larva se desarrolló el pie rudimental y en el segundo día de desarrollo de la veliger intracapsular se pudo divisar el opérculo que promedió  $43,71 \pm 8,03 \mu\text{m}$  ( $n= 20$ ) de largo. A partir del 6° día se advirtieron notoriamente las características morfológicas que determinan el estadio de larva veliger (dpe:  $106,32 \pm 9,68 \mu\text{m}$ ): velo ciliar bilobulado, protoconcha, pie y opérculo, masa visceral indiferenciada, un par de estatocistos y una incipiente cavidad del manto poco profundizada.

El periodo de desarrollo intracapsular de la veliger se extendió entre 2 y 6 días. En el 2° día de la veliger (Figura 4.6B), presentó un conspicuo crecimiento del opérculo ( $60,28 \pm 7,61 \mu\text{m}$ ,  $n= 29$ ) que superó en extensión el largo del pie. El plegamiento de la

larva continuó ampliándose, así como los lóbulos y cilias se extendieron en largo. Los tejidos internos que conforman la masa visceropallial se diferenciaron posteriormente en órganos que fueron observados claramente a través de la protoconcha transparente: esófago, estómago, glándulas digestivas (derecha e izquierda) e intestino, y que previamente a la eclosión, también fue posible distinguir la apertura bucal, las dos cámaras que constituyen el estómago (estómago larval y cámara pre-intestinal) y el ano. En ese periodo también se observó la constitución del músculo retractor larval, que habilitan los movimientos de retracción del cefalospódio hacia dentro de la protoconcha con el posterior encierro de la apertura de la misma por el opérculo. Con el crecimiento continuo de la larva, los movimientos rotatorios se vieron restringidos por la falta de espacio dentro de la ovicápsulas, siendo posibles sólo los movimientos ciliares y de retracción en el periodo que antecedió la eclosión de la veliger.

La eclosión de la veliger se observó entre el 3° y 6° día del desarrollo intracapsular (Figura 4.6C). A través de un movimiento incesante de las cilias sobre un determinado punto de la pared de la ovicápsula y de constantes embestidas, la veliger logró fracturar la pared y desvincularse de la ovicápsula. Luego, las larvas pasaron a nadar dentro de la masa ovígera y se observó un proceso de licuefacción de la pared de la misma. A partir de este punto, la masa ovígera figuró un cambio en su aspecto, adelgazándose y aparentando fragilidad. Al mismo tiempo, fue observado un comportamiento gregario de las veliger en un determinado punto, embistiendo con el batido de las cilias contra la pared interna de la masa ovígera hasta su ruptura. Libres en la columna de agua en los contenedores, las larvas presentaron movimientos erráticos y poco control de flotabilidad, quedando algunas veliger atrapadas en la superficie del agua.

El desenvolvimiento de las estructuras pos eclosión que conforman la veliger prosiguió regularmente. El pie creció gradualmente hasta sobrepasar el largo del opérculo ( $72,86 \pm 3,22 \mu\text{m}$ ,  $n= 21$ ) al cabo del 3° día pos eclosión (Figura 4.6D). Con el incremento de tamaño de la protoconcha larval (tipo II) también se observó un aumento en el grado de plegamiento de la larva. El tracto digestivo presentó un notable desenvolvimiento: el intestino se alargó, acentuando su curvatura desde la porción posterior hacia el lado izquierdo y menos profundo de la cavidad del manto; la glándula digestiva izquierda incrementó en volumen y acentuó su pigmentación mientras que la glándula derecha no presentó cambio en su dimensión sino una leve alteración en su coloración, oscureciendo su tono amarillento (Figura 4.6D). En el sexto día pos eclosión, las principales alteraciones se observaron con el desenvolvimiento de un grupo de células de



pigmentación rojillo en la parte ventral subyacente al estómago larval, así como la visualización de las primeras contracciones del corazón larval, localizado en la porción posterior y dispuesto dorsalmente sobre la porción media del intestino. Luego, en algunos cultivos las veligers en donde se continuó siguieron alimentándose del fitoplancton con las renovaciones de agua en los contenedores con el fin de que se alimentan del fitoplancton, aunque no se observaron cambios morfológicos en su estructura fue notable el continuo crecimiento de la protoconcha tipo II.

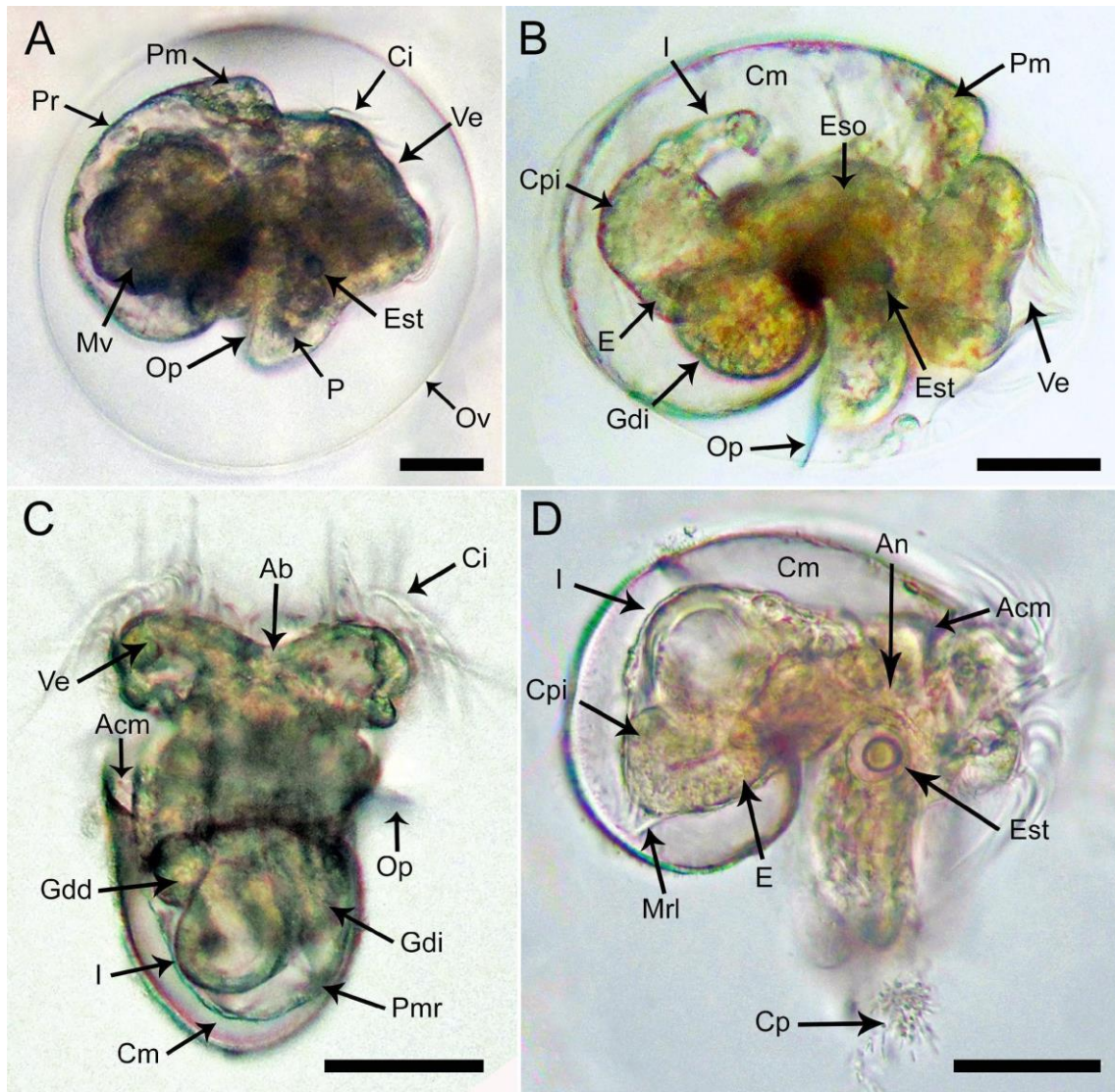


Figura 4.6. Estadios de desarrollo de la larva veliger *in vivo* de *S. lessonii*. **A.** Vista lateral derecha de la veliger temprana, masa visceral indiferenciada y pie rudimental. **B.** Vista lateral derecha de la veliger desarrollada previa eclosión, sistema digestivo desarrollado con visible diferenciación de las glándulas digestivas. **C.** Vista ventral de la veliger pos-eclosión. **D.** Vista lateral derecha de veliger pos-eclosión. Abreviaturas: Ab, apertura bucal; Acm, apertura de la cavidad del manto; An, ano; Ci, cilias; Cm, cavidad del manto; Cp, cilias del pie; El, estómago larval; Eso, esófago; Est, estatocisto; Gdd, glándula digestiva derecha; Gdi, glándula digestiva izquierda; I, intestino;

Mrl, músculo retráctil larval; Mv, masa visceropialial; Op, opérculo; P, pie; Pm, pliegue del manto; Pr, protoconcha; Ve, velo. Escalas: 50  $\mu\text{m}$ .

La longevidad de las veliger se extendió entre 3 y 11 días ( $8,14 \pm 3,04$ ) pos-eclosión para 12° C de temperatura y entre 3 y 9 días ( $6,70 \pm 1,85$ ) para 20° C. No se observaron individuos en estadios de pediveliger, asentamiento o comportamiento de competencia de larvas en el periodo de cultivo estudiado. Sólo en uno de los contenedores a temperatura de 12° C, en el 8° día pos-eclosión, se observaron algunas pocas larvas en el fondo apoyadas sobre el velo bilobulado con batimientos esporádicos de las ciliias. También resultaron ineficaces los intentos en estimular el asentamiento con el suministro de rocas basálticas de canto rodado y sedimento compuesto de gravas ambos utilizados en la pecera de mantenimiento de los individuos adultos. Es importante mencionar que el mantenimiento de los cultivos de larvas veliger de *S. lessonii* y por consecuencia el seguimiento de su desarrollo fue marcado por grandes dificultades en encontrar condiciones adecuadas para lograr la metamorfosis al estadio de juvenil.

#### **4.3.4. Organogénesis en larva veliger**

A partir de la constitución morfológica de la larva veliger, se estudió detalladamente la organogénesis a través de preparados histológicos hasta el 6° día pos eclosión. Las descripciones se enfocaron en la comparación entre los estadios intracapsular y planctotrófico (libre) de la veliger, con respecto al desarrollo de los tejidos que componen el manto, apertura y la cavidad del manto, así como del aparato digestivo. El manto en la veliger intracapsular de *S. lessonii* se observó formado por un tejido delgado, entre 1,9-2,2  $\mu\text{m}$  de espesor, que encierra completamente la región visceropialial larval. Con el desarrollo de la larva, este tejido presentó una retracción hacia el interior de la protoconcha y simultáneo adelgazamiento (0,7-0,9  $\mu\text{m}$  de espesor), volviéndose poco conspicuo. En el límite de la protoconcha se distinguió un grupo de células de mayor espesor del manto, principalmente en la región dorsal, que corresponden al pliegue del manto (Figura 4.7A) y que presentaron, al contrario del manto, hipertrofia con el crecimiento de la protoconcha larval. Previo a la eclosión y concurrente al desarrollo de la masa visceral, se observó la profundización de la cavidad del manto dorsalmente desde el lado derecho del pliegue del manto hacia la porción posterior izquierda de la larva (Figura 4.7B), y que se acentuó pos eclosión. En ese periodo el aparato digestivo se

desarrolló a partir de un conglomerado celular indiferenciado, la masa visceropalial, hasta observarse la constitución del tracto especializado.

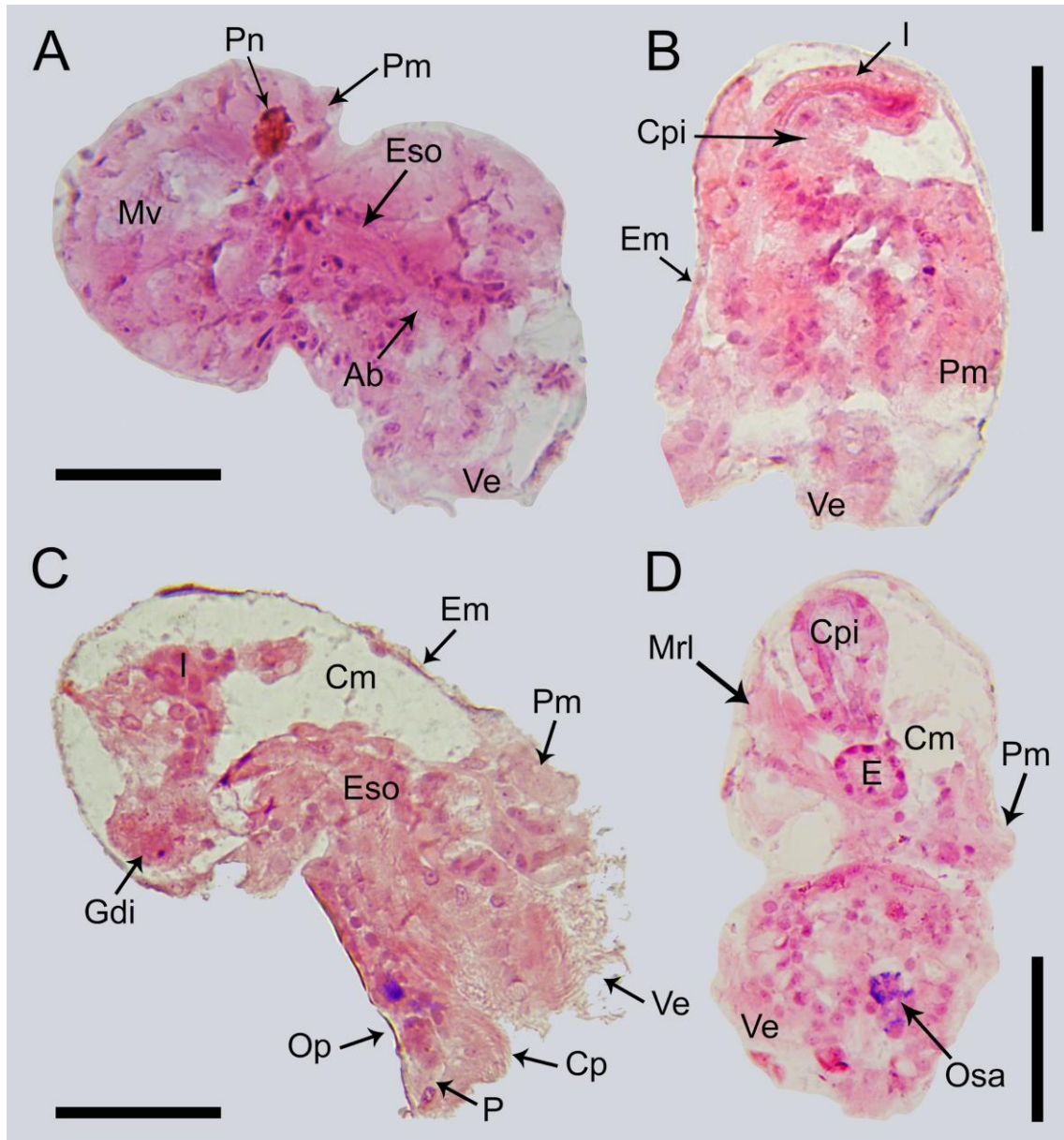


Figura 4.7. Comparación histológica de la organogénesis entre estadios larvales de la veliger previa y posterior a la eclosión. **A.** Preparado parasagital larva veliger temprana pre-eclosión. **B.** Preparado transversal veliger intracapsular madura, vista dorsal. **C.** Larva veliger 2 días pos-eclosión, vista lateral. **D.** Larva veliger 2 días pos-eclosión, vista dorsal. Abreviaturas: Ab, apertura bucal; Acm, apertura de la cavidad del manto; An, ano; Cm, cavidad del manto; Cp, cilias del pie; El, estómago larval; Em, epitelio del manto; Eso, esófago; Est, estatocisto; Gdd, glándula digestiva derecha; Gdi, glándula digestiva izquierda; I, intestino; Mrl, músculo retráctil larval; Mv, masa visceral; Op, opérculo; Osa, órgano sensorial apical; P, pie; Pn, protonefridio; Pm, pliegue del manto; Pr, protoconcha; Ve, velo. Escalas: 50  $\mu$ m.

La apertura bucal dispuesta ventro-anterior a la cámara oral y entre los lóbulos del velo, se advirtió seguida del esófago, cilíndrico y uniformemente ciliado (Figura 4.7C), que se conecta posteriormente a una primera cámara menor del estómago larval, en la porción ventral, donde también se conectan las dos glándulas digestivas ubicadas lateralmente encontradas (izquierda y derecha). La glándula digestiva izquierda pos eclosión y con el inicio de alimentación larval por filtración, incrementó considerablemente en tamaño con relación a la dispuesta a la derecha. La primera cámara continua a una segunda mayor, denominada cámara pre-intestinal o “style sac”, con pared compuesta por tejido muscular donde se observó intenso movimiento de largos cilios celulares hacia el lumen (Figura 4.7D). El intestino larval se conecta dorsalmente a la segunda cámara a través de un surco que gira hacia el lado izquierdo de la veliger extendiéndose anteriormente y volviendo a cruzar hacia el lado derecho donde desemboca ventralmente a través del ano en la cavidad del manto.

A través de los preparados histológicos se pudo examinar también la organización músculo retractor larval, compuesto por un conjunto de fibras de miocito que se extiende ventralmente en la veliger (Figura 4.7D). Las fibras conectan anteriormente los lóbulos ciliares y el pie larval, en la región del cefalospodio, a la pared interna del epitelio del manto en la porción posterior del lado izquierdo de la veliger. En la región anterior de la veliger libre, posicionado centralmente entre los dos lóbulos del velo ciliar, se observó un conjunto de células de composición ácida (marcado con hematoxilina) con disposición circular en forma de corona (Figura 4.7D) que conforman el órgano sensorial apical de la larva.

### **5.3.5. Morfología de la protoconcha**

La formación morfológica de la protoconcha se observó a través de imágenes obtenidas en MEB (Figura 4.8). En el principio de la formación de la larva veliger se pudo observar la deposición de una fina y translúcida capa bajo el periostraco, en forma de placas laminares que terminaron por encajarse entre sí, sobre toda la extensión del manto recubriendo la masa visceral. La estructura de la protoconcha embrionaria (protoconcha tipo I) que consistió en desarrollo de hasta tres cuartos de una espiral completa, se advirtió como una superficie irregular con presencia de protuberancias esparcidas principalmente en la porción dorsal de la cara externa (Figura 4.8A). Las protoconchas embrionaria (tipo I) y larvaria (tipo II) de *S. lessonii* mostraron una espiral hiperstrófica (Figura 5.8B) que



se amplifica con el desenvolvimiento de la veliger. A partir del segundo día del desarrollo de la larva veliger intracapsular, con la ampliación del plegamiento del embrión y conclusión de la primera vuelta espiral, se distinguió la formación del ombligo de la protoconcha tipo I (Figura 4.8C). Sobre el margen de esa estructura se pudo diferenciar una espícula con dirección ventral (Figura 4.8D).

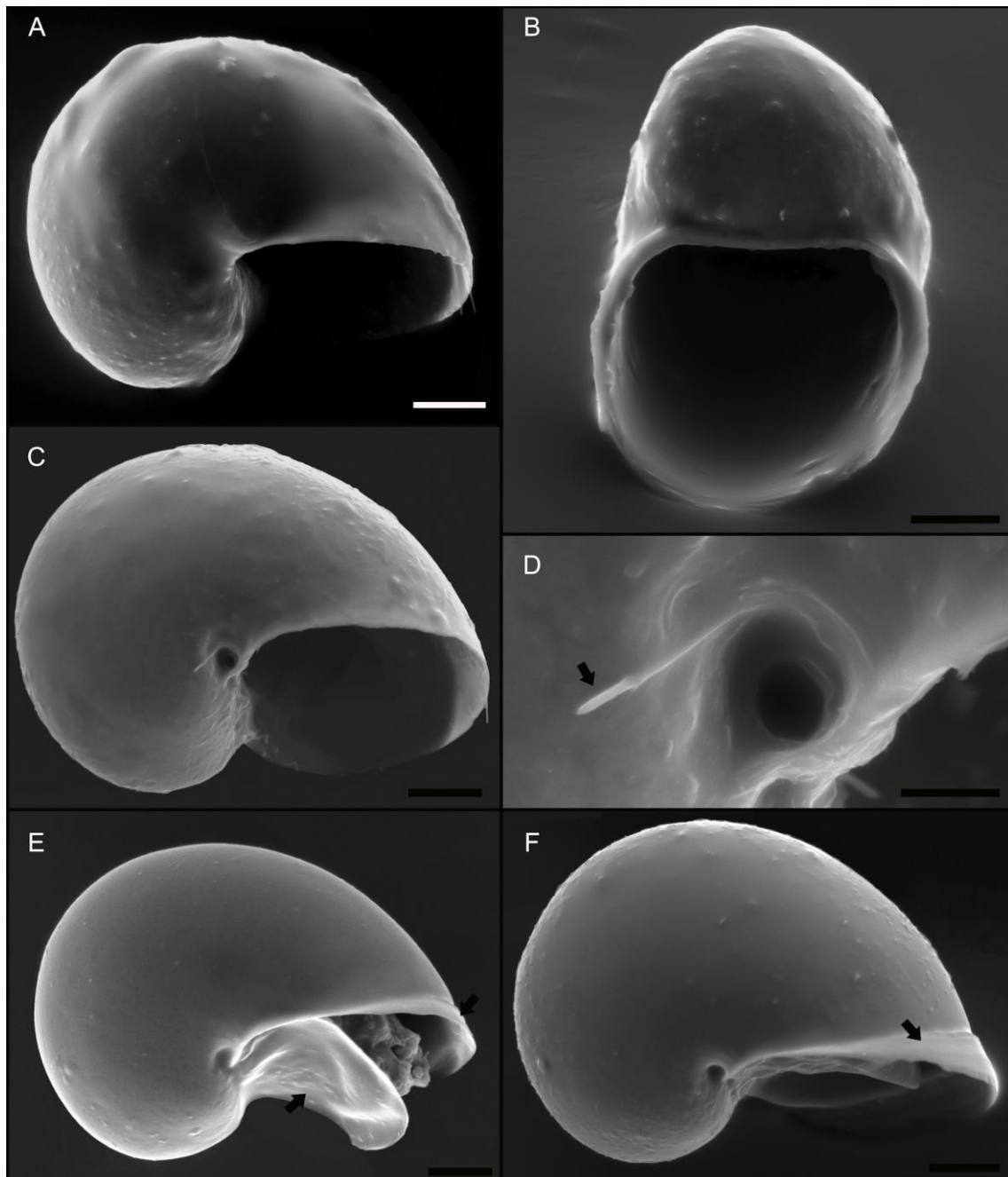


Figura 4.8. Imágenes en microscopía electrónica de barrido (MEB) de la protoconcha larval de *S. lessonii* pre y pos eclosión. **A.** Protoconcha con pequeñas protuberancia en la cara externa en larva pre-eclosión. **B.** Vista de la apertura de la protoconcha pre-eclosión. **C.** Protoconcha pre-eclosión. **D.** Detalle de la ornamentación (flecha) presente en la cara externa en estadio tardío de la veliger. **E.** Detalle del opérculo en estadio pre-eclosión (flecha) y origen protoconcha larval (tipo II). **F.**



Formación del labio sinogeral sobre el extremo de la apertura de la protoconcha (flecha) en el estadio tardío de la veliger. Escalas: 20  $\mu\text{m}$ .

En el 3° día del desarrollo de la veliger se advirtió el principio de la deposición de la estructura que conforma la protoconcha larval (tipo II). La transición entre esta y la protoconcha I quedó visiblemente marcada por una leve discontinuidad de la superficie. La superficie externa de ambas protoconcha I y II (después de la eliminación del periostraco) se observó regular y lisa. En la Figura 4.8E es posible visualizar el opérculo y su conexión con la base de la espiral de la protoconcha en la región ventral. El crecimiento de la protoconcha tipo II agregó un cuarto de espiral más allá del protoconcha tipo I en larvas observadas en el 21° día de desarrollo. En la Figura 4.8F se puede observar el crecimiento de la banda de la protoconcha tipo II, donde se indica (flecha) la amplitud del diámetro con respecto a la tipo I.

Por otro lado, la protoconcha biomineralizada presentó carácter hidrofóbico, condición observada debido al eventual atrapamiento de las larvas libre nadantes a la superficie del agua en reposo de los contenedores (interface aire agua).

## 5.4. Discusión

El tiempo de desove en *S. lessonii* (60 - 180 min.) es semejante a al descrito para otra especie del género, *S. pectinata* (40-107 min.), en el norte de Túnez (Slama et al., 2018), coincidiendo en latitud y temperatura del agua de cultivo, pero dista de las 8 horas observadas en *Benhamina obliquata* (Borlan, 1950). La mayoría de las 27 especies de la familia Siphonariidae de las 29 existentes revisadas por Hodgson (1999), depositan masas ovígeras que quedan cementadas sobre el sedimento y solo 2 especies, *S. tasmanica* y *S. virgulata*, producen masas ovígeras pelágicas (Creese, 1980; Quinn, 1988b). Los desoves observados en su mayoría también se producen sobre el sedimento no sumergido dispuesto en la pecera, aunque su remoción se observó sencilla no pareciendo estar de alguna forma “cementada” sobre el mismo. Por otro lado, un número bajo de masas ovígeras fueron encontradas sumergidas, pudiendo ser resultado de desoves cercanos a la superficie del agua o masas depositadas sobre el vidrio lateral de la pecera que por baja adhesión terminan desplazándose hacia el agua. Estas observaciones sugieren una preferencia por los desoves no sumergidos pese a que la desecación de las masas ovígeras expuestas al aire puede ser un factor de estrés, influyendo sobre el desarrollo de los

embriones (Przeslawski et al., 2005). Por otro lado, los desoves sumergidos de masas ovígeras sobre sedimentos en zona de intermareal parecen no ser favorables en zonas expuestas al oleaje. Entretanto, esa disposición confirma las observaciones del presente trabajo realizadas *in situ* acerca de la presencia de puestas en zonas de intermareal medio y superior para la población del muelle de Villa Gesell, y concuerda con lo descrito para poblaciones de Mar del Plata (Olivier y Penchaszadeh, 1968) y dos poblaciones en la región patagónica argentina, de Barranca Blanca en el Golfo San Matías y Punta Este en Golfo Nuevo (Zabala et al., 2018).

Knox (1955) ha sugerido una relación directa entre el modo de desarrollo y las zonas del intermareal donde especies de sifonáridos desovan, con especies de desarrollo directo asociadas a desoves en zonas altas del intermareal mientras que las de desarrollo planctónico en zonas bajas. Chambers y MacQuaid (1994b) en su revisión de 26 especies del género *Siphonaria* reconocen esta tendencia entre desarrollo y zonas del intermareal. En la población estudiada, aunque individuos de *S. lessonii* se encuentren tanto en sectores del medio como del supralitoral, donde además se observó una diferenciación en la composición de tallas, los desoves y las masas ovígeras fueron encontrados en su mayoría en el intermareal inferior sobre o cercanos a la comunidad de mejillines. Estas observaciones coinciden con lo descrito por Olivier y Penchaszadeh (1968) para Mar del Plata.

Las mayores frecuencias de oviposición observadas en este estudio fueron entre 1° y 2 de septiembre con 6 oviposiciones (14,63%), y entre el 14 y 15 del mismo mes, con 5 (12,20%), de un total de 41 puestas. Estos periodos corresponden con fases de luna nueva y llena respectivamente; además los desoves ocurrieron con mayor frecuencia durante los periodos nocturno, con 24 puestas (58,54%) y diurno en las primeras 6 horas del fotoperiodo con 12 puestas (28,27%). Algunos trabajos señalan que especies de sifonáridos desovan durante determinados períodos lunares y momentos del día (Creese, 1980; Hirano e Inaba, 1980; Branch, 1981; Quinn, 1988b; Chambers, 1994; Iwasaki, 1995; Pal y Hodgson, 2005). El factor lunar, que condiciona los ciclos de mareas, tendría una relación con la regulación de la oviposición teniendo en cuenta el desarrollo planctotrófico de algunas especies (Iwasaki, 1995), mientras que los periodos de desove entre la noche y la mañana sugieren relación con la desecación y el posible estrés osmótico en las puestas (Iwasaki, 1995; Ocaña y Emson, 1999). Hodgson (1999) además señala finalmente que la cópula, el desove y el desarrollo larval en *Siphonaria* podrían estar programados en función del ciclo lunar y de mareas para aumentar las posibilidades

de supervivencia de las larvas puesto que larvas planctotróficas, y por ende las masas ovígeras, necesitan estar sumergidas anteriormente a la eclosión garantizando las mejores condiciones ambientales para su desarrollo.

Las formas y dimensiones de las masas obtenidas en el experimento se incluyen en el amplio espectro observado para miembros de la familia Siphonariidae (Mapstone, 1978; Chambers y McQuaid, 1994a; Ocaña y Emson, 1999) y tendrían relación directa con el movimiento realizado por el adulto durante la oviposición (Hodgson, 1999). Además, la caracterización morfológica de la masa ovígera contribuye a su diferenciación en regiones habitadas por más de una especie de representantes de esa familia, como ocurre en la región patagónica argentina (Güller et al., 2016). Es importante destacar que si bien la mayoría de las ovicápsulas contuvieron un solo embrión, también se observaron cápsulas vacías, así como dos o más embriones compartiendo la misma cápsula como lo observado en *S. pectinata* (Slama et al., 2018) pero dista de las reportadas en *Benhamina obliquata* donde se hallaron hasta 30 embriones por ovicápsula (Borlan, 1950). Ríos et al. (1987) encontró ovicápsulas de *S. lessonii* que contenían hasta 6 embriones para una población del Estrecho de Magallanes, en el extremo sur de su distribución.

La fecundidad observada en las oviposiciones en laboratorio con relación al número de huevos/puesta fue más baja ( $12.455,76 \pm 6.669,83$ ) en comparación a lo encontrado por Olivier y Penchazsadeh (1968), entre 20.000 y 80.000 huevos, sin embargo compatible con resultados encontrados para otras especies de sifonáridos con desarrollo planctotrófico como *S. denticulata*, entre 12,200 y 26,800 huevos (Creese, 1980), *S. capensis*, aproximadamente 20,000 huevos (Chambers y McQuaid, 1994b), y *S. pectinata*, ( $10.546,5 \pm 8.176,7$ ) (Slama et al., 2018). El material granular perivitelínico observado en un primer momento posterior al desove en el interior de las ovicápsulas se asemeja al material nutritivo descrito para otros sifonáridos (Marcus y Marcus, 1960, Zischke, 1974, Zabala et al., 2018). Sin embargo, dicho material parece consumirse rápidamente en el transcurrir de los primeros clivajes, hecho también observado en tres especies de gasterópodos marinos de la familia Vermetidae (Gastropoda: Caenogastropoda) descritos de la costa mediterránea ibérica (Calvo Revuelta, 1999). Thorson (1946, 1950) estableció una relación entre especies de invertebrados marinos bentónicos que en bajas latitudes suelen producir huevos pequeños que al diferenciarse en larvas estas deben alimentarse (planctotróficas en general), mientras que especies de altas latitudes producen huevos grandes que se diferencian en larvas que no se alimentan de plancton sino que consumen vitelo (lecitotróficas). Este patrón se observa en casi todos

los filos animales y estaría fuertemente mediado por la cantidad de energía contenida en el huevo (Miner et al., 2005). Chambers y McQuaid (1994b) corrobora esa relación entre especies del género *Siphonaria* y los resultados obtenidos en Villa Gesell en *S. lessonii* son acordes también con el patrón planctotrófico, con cápsulas ovígeras de proporciones pequeñas (<300µm) en una especie con desarrollo indirecto.

El modo de desarrollo larvario ha sido interpretado y clasificado en función de una variedad de criterios por diferentes autores (Mileikovsky, 1971, 1975; Jablonski y Lutz, 1983; Grahame y Branch, 1985; Chambers, 1994 thesis). El desarrollo de *S. lessonii* en la población de Villa Gesell es indirecto con la eclosión de una larva de tipo veliger planctotrófica libre nadante, lo que coincide con estudios previos de Olivier y Penchaszadeh (1968), Rios (1987), Zabala et al. (2018), para otras poblaciones de la especie estudiada. El desarrollo ontogénico observado hasta el estadio de veliger libre en general también concurre con las descripciones para otras especies con desarrollo indirecto de la familia Siphonariidae (Mapstone, 1978; Ocaña y Emson, 1999; Huang y Chan, 2000; Slama et al., 2018; Page et al., 2019). Los patrones espaciales y temporales de los primeros clivajes de *S. lessonii*, las sucesivas divisiones mitóticas del embrión, corresponden al encontrado ampliamente entre integrantes de los Pulmonata y Opisthobranchia y correspondería a una característica compartida en el taxón monofilético de los Euthyneura (Van den Biggelaar y Haszprunar, 1996).

Como en muchos Spiralia, el embrión de *S. lessonii* pasa por una larva trocófora antes de llegar a una veliger característica. El concepto de larva trocófora utilizado como criterio fue el revisado por Rouse (1999) que se caracteriza principalmente por la presencia de una banda ciliada apical, otra lateral (prototroca) y de protonefridios larvales. Según el autor, esta forma larval corresponde a una sinapomorfía que comparten algunos grupos de invertebrados: Annelida (*sensu lato*), Echiura, Entoprocta, Mollusca y Sipuncula; constituyendo de este modo junto a su antecesor común un taxón monofilético denominado Trochozoa. Un análisis filogenético reciente ha corroborado que todos los celomados con desarrollo embrionario espiral, modelo concurrente entre los clados recién citados, comparten un mismo modelo de larva trocófora con ligeras modificaciones entre los grupos (Struck et al., 2014). Dichas modificaciones pueden derivar en la génesis de otras formas larvarias como la setígera en los anélidos, la pelogosfera en los sipuncúlidos o, en este caso, la veliger en los moluscos. Excepto en Archeogastropoda donde la trocófora es la forma larval libre nadante que se metamorfosea directamente en la forma adulta (Van Den Biggelaar, 1993), en los demás grupos de gasterópodos, incluyéndose a

los Heterobranchia, la trocófora se desarrolla por completo intracapsularmente donde da origen a una forma intermediaria, la veliger que mediante metamorfosis pasa a la forma adulta.

Los intervalos en que transcurrieron los primeros clivajes en este estudio fueron más cortos a los descritos por Zabala et al. (2018) a una temperatura de 14°C para *S. lessonii* de poblaciones del norte patagónico, y ligeramente más largos que los encontrados para *S. pectinata* entre 13° y 27°C (Slama et al., 2018) y *S. diemenensis* a 15°C (Mapstone, 1978). En vista a la dificultad en precisar el traspaso entre los estadios de mórula y blástula en las observaciones ordinarias, para los registros de tiempo de desarrollo se tomaron ambos estadios en conjunto. Esos estadios se observaron entre 24h y 48h (12° y 20°, respectivamente), siendo más tardías, que las 5h en *S. japonica* a 24°C (Huang y Chan, 2000) y entre las 25-28h en *S. diemenensis* a 15°C (Mapstone, 1978); convinieron con los tiempos de *S. pectinata* en el Mediterráneo (Slama et al., 2018) y ocurrieron más tempranamente que para las dos poblaciones de *S. lessonii* del norte patagónico, 2-3 días para mórula y 4 días blástula (Zabala et al., 2018). Gástrula se alcanzó dentro de los 3-4 días posteriores a la oviposición, lo que coincidió con los resultados de Zabala et al. (2018) a 13°C y Slama et al. (2018) para temperatura 18-20°C; Ocaña y Emson (1999) observaron la conclusión de la gastrulación en el 6° día para *S. pectinata* de poblaciones de Gibraltar mientras Mapstone (1978) para *S. diemenensis* de las costas de Victoria (Australia) los halló en el 2° día.

En el desarrollo de los estadios larvarios, las trocóforas y veliger en *S. lessonii* fueron observadas entre el 5°-6° días y 7°-9° días de la oviposición, entre los 12° y 20°C, respectivamente, siendo semejantes a con lo encontrado por Zabala et al. (2018), entre 5 y 6 días y entre 7 y 8 días, respectivamente. Slama et al., (2018) halló en los diferentes rangos de temperaturas (13°-27°C) una gran variación en los tiempos de desarrollo para *S. pectinata* hasta los estadios de trocófora (de 21,4h a 6 días) y veliger (de 2 a 10 días). El estadio de veliger se completó en un periodo comparativamente más corto tanto en *S. diemenensis* entre 4 y 5 días (Mapstone, 1978) y cuanto en *S. japónica* entre 4 y 6 días (Huang y Chan, 2000). La eclosión de la veliger se dio entre los 9 y 13 días pos eclosión. Resultados similares fueron encontrados para las poblaciones de Mar del Plata, entre 8 y 9 días a temperaturas entre 17-18°C (Olivier y Penchaszadeh, 1968), y el norte patagónico 9 a 11 días a 13°C (Zabala et al., 2018). Por otro lado, larvas de *S. pectinata* tardaron más en eclosionar en Gibraltar en un periodo de 14-21 días, entre 14° y 19°C (Ocaña y Emson, 1999), mientras que en la costa de Túnez los resultados presentaron gran variación en

relación con la temperatura, 8 días (25-27°C), 11 días (18-20°C) y 16 días (13-15°C) (Slama et al., 2018).

En este estudio el corto periodo de longevidad de las larvas cultivadas resultó insuficiente para que la veliger libre alcance el estado de competencia metamórfica, que según Hadfield et al. (2001), se define como el desarrollo de la capacidad de la larva para transitar una completa metamorfosis producida por factores externos o internos. Sin embargo, se pudo observar diferencias en la longevidad con relación a la temperatura, donde a 12°C se alcanzó mayor longevidad (23 días) de las larvas con respecto a 20°C (19 días) aunque estadísticamente estas diferencias no fueron significativas. Slama et al. (2018) indicó que larvas de *S. pectinata* lograron mayor supervivencia y eventual asentamiento en cultivos con baja densidad larval y baja temperatura (13-15°C); y también señaló que la supervivencia larval a mayores densidades y altas temperaturas fueron notoriamente más bajas. Marinus (2016) en experimentos con *S. australis* observó asentamiento y metamorfosis de larvas completados 30 días de desarrollo a 17°C y únicamente en cultivos con presencia de ejemplares adultos vivos de la especie. A su vez, Page et al. (2019) observó asentamiento y metamorfosis en *S. denticulata* solamente en cultivos con presencia de fragmentos de concha de adultos. Estos resultados evidencian la complejidad de factores que influyen en el asentamiento y la plasticidad en los ritmos de desarrollo embrionario y larval en función de la temperatura entre especies de sifonáridos de distintas regiones. Ese aspecto puede ayudar a explicar en particular la amplia distribución geográfica de *S. lessonii* en el cono sur de continente americano (Güller et al., 2016) y también de la familia Siphonariidae en los demás continentes, a excepción de Antártica (Hubendick, 1946; Jenkins, 1981; Chambers et al. 1996; Dayrat et al., 2014; Boukhicha et al., 2015; Giribet y Kawauchi, 2015; Güller et al., 2016; González-Wevar et al., 2018).

La temperatura del agua ejerció un papel clave en la regulación de los ritmos de desarrollo y crecimiento embrionario de *S. lessonii*. Si bien no se observaron alteraciones morfológicas u ontogénicas, el tiempo de desarrollo hasta la eclosión de la veliger (estadio libre) se vio reducido considerablemente en 3 días a mayor temperatura (20°C). Slama et al. (2018) encontró resultados similares para *S. pectinata* en el mar Mediterráneo de igual modo que Pechenik et al. (2003) para el heterobranquio *Amphibola crenata* en el sur de Nueva Zelanda. Esa correlación fue encontrada para otros gasterópodos marinos (Scheltema, 1966; Pechenik, 1984; Zimmerman y Pechenik, 1991; Watt et al., 2003; Deschaseaux et al., 2011; Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán, 2016; Wang et al., 2017).

El incremento tanto en el desarrollo (tiempo) como en el crecimiento (talla) en función del aumento de la temperatura se advirtió principalmente en los dos primeros clivajes celulares (2 y 4 células). La correlación positiva entre ese incremento y temperatura puede estar relacionada al aumento de la tasa metabólica y consecuente consumo del material vitelino del embrión al principio del desarrollo, especialmente en especies planctotróficas (Hochachka y Somero, 2002; Verberk et al., 2011; Whitehill, 2012; Przeslawski et al., 2015). En organismos ectotérmicos acuáticos y particularmente en los estadios larvales, ese balance entre demanda de oxígeno y suplemento está intrínsecamente relacionado a la variación de la temperatura del agua (Verberk et al., 2011; Przeslawski et al., 2015). En cambio, en los estadios siguientes esa correlación disminuye y luego se observa una inversión en la comparación para el estadio de veliger intracapsular (pre-eclosión) y para el tiempo de desarrollo en el estadio de veliger libre, (post-eclosión). Przeslawski et al. (2015) sostiene que, salvo variaciones en algunos clados, los estadios embrionarios en organismos marinos en general son menos susceptibles al estrés térmico que los larvales, lo que podría deberse a la presencia de factores de protección (defensas celulares) en el huevo (Hamdoun y Epel, 2007). Por otro lado, Wang et al. (2017) advirtió que en la especie con desarrollo planctónico *S. japónica*, los estadios encapsulados son más sensibles a aumentos en la temperatura que el estadio larval planctónico. Conforme citado anteriormente, las puestas se observaron depositadas mayormente en zonas del intermareal medio y en menor número en el intermareal superior. En ese marco se puede considerar que los primeros estadios embrionarios y tal vez larvarios se desarrollan bajo influencia de la temperatura atmosférica, por lo tanto, bajo una mayor amplitud térmica, hasta que la marea arrastre la masa ovígera al agua donde la variación es relativamente menor.

Las medidas de las cápsulas ovígeras de *S. lessonii* no presentaron variaciones entre los diferentes estadios de desarrollo aun con el crecimiento del embrión/larva. Zabala et al. (2018) señaló diferencias significativas entre cápsulas de la especie en diferentes condiciones ambientales sin embargo no significativas entre estadios. Para la población de *S. diemenensis* en Victoria (Australia) tampoco se encontraron variaciones entre estadios (Mapstone, 1978).

En crecimiento diario, si bien se dan entre estadios ontogénicos distintos, indican un mayor incremento en las tallas a mayor temperatura del 3° hasta el 10° día del desarrollo, cuando se observó una reducción del ritmo de crecimiento en las larvas veligers libres a 20° C, mientras las larvas intracapsulares a 12° C pasaron a tener un

incremento mayor llegando a observarse incluso mayor crecimiento en el 12° día a esta temperatura. Cabe puntualizar que los primeros estadios se desarrollan en intervalos más cortos de tiempo en comparación a los estadios de veliger intracapsular libre.

La comparación entre los estadios de larva veliger intracapsular (pre-eclosión) y veliger libre (post-eclosión) indicaron desarrollo de las estructuras que componen la región visceropalial, asociada al crecimiento de la protoconcha, y el cefalospodio. El velo es simple y compuesto de dos lóbulos ampliamente ciliados al igual que en otros heterobranquios (Bickell y Chia, 1979; Little et al., 1985; LaForge y Page, 2007; Page et al., 2019), y difiere de los prosobranquios que frecuentemente presenta velos más largos con lóbulos subdivididos (Brito-Manzano et al., 1999; Enriquez-Díaz et al., 2015). Little et al., 1985 sugiere que el largo y la complejidad de la estructura del velo están relacionadas al tipo de desarrollo larval y el periodo planctónico de la misma. Recientemente, investigaciones en ecofisiología del desarrollo han descrito procesos de potencial adaptación y plasticidad sensibles a variaciones ambientales que interpretan incluso cambios estructurales en el desarrollo de un organismo (Spicer y Burggren, 2003; Spicer y Rundle, 2007). El término heterocaria se ha propuesto como un posible mecanismo para explicar alteraciones en los ritmos del desarrollo ontogénico en el patrón evolutivo de una especie (Tills et al., 2013; Mueller et al., 2015; Rundle y Spicer, 2016).

El epitelio del manto al principio de la formación de la veliger intracapsular estuvo constituido integralmente por células cuboides derivadas del ectodermo que formaron un conjunto celular denominado “campo de la concha” (Kniprath, 1981), responsable por secretar la concha embrionaria, así como lo observado en otros gasterópodos (Kniprath, 1981; Haszprunar et al., 1995). Además, concurrente al crecimiento de la protoconcha larval, estas células presentaron un adelgazamiento integral en la porción dorsal resultando un epitelio menos conspicuo. Por otro lado, las células que componen el pliegue del manto, situadas directamente debajo del margen de la protoconcha, se ensancharon. Este proceso parece estar vinculado al propio origen y crecimiento de ambas protoconchas embrionaria (tipo I) y larval (tipo II), donde la primera estaría asociada a la secreción de una matriz orgánica (periostraco) en todo el campo de la concha; mientras el desarrollo de la protoconcha larval estaría relacionado a las células del pliegue del manto (Kniprath, 1977; Jablonski y Lutz, 1980; Kniprath, 1981; Bielefeld y Becker, 1991; Marin y Luquet, 2004).

Los procesos de profundización del manto y retracción del pliegue del manto a partir del desarrollo de la veliger pre-eclosión también fue observado en el desarrollo de



*S. denticulata* (Page et al., 2019) y de otra especie de heterobranquio, *Doridella steinbergae* (Bickell y Chia, 1979). La profundización del tejido del manto hacia dentro de la región posterior visceropalial de la veliger corresponde al origen de la cavidad del manto desde el lado derecho de la larva (Switzer-Dunlap y Hadfield, 1977; Bickell y Chia, 1979; Ruthensteiner, 1997; Page y Ferguson, 2012). Este proceso, relacionado a la torsión ontogénica observada en los gasterópodos en general, ocurre de una forma distinta en heterobranquios pero en especial en sifonáridos en razón del desplazamiento de la posición de la apertura de la cavidad del manto hacia el lado derecho post metamorfosis (Page, 2003).

El aparato digestivo de *S. lessonii* corresponde aproximadamente a descripciones realizadas en otros heterobranquios de desarrollo planctotrófico (Thompson, 1967; Bickell y Chia, 1979; Little et al., 1985; Gibson, 2003; Page et al., 2019). Previo a la eclosión la veliger, el conjunto del aparato tuvo un notable desarrollo que se acentuó posiblemente con el inicio de la alimentación de la larva planctotrófica libre, post-eclosión. En el proceso se observó principalmente la expansión de la glándula digestiva izquierda con respecto a la glándula digestiva derecha. Esta disparidad también fue descrita en otros heterobranquios (Bickell et al., 1981; Little et al., 1985; Gibson, 2003; Page et al., 2019) así como en Caenogastropoda (Page y Pedersen, 1998; Page y Ferguson, 2012), no obstante, marca una diferencia con la veliger planctotrófica de *Neritimorpha* (Page y Ferguson, 2012), donde ambas glándulas digestivas presentan medidas similares. Además, en *S. lessonii* la glándula digestiva izquierda presentó mayor pigmentación que la glándula digestiva derecha a los 3 días pos-eclosión. Kempf y Willows (1977) y Little et al. (1985) indican que esta pigmentación deriva de los pigmentos fotosintéticos de las algas ingeridas por la veliger. Page et al. (2019), a través de estudio ultraestructural de las glándulas digestivas de *S. denticulata*, registró actividad fagocítica solamente en la glándula digestiva izquierda mientras que en la derecha solo actividad secretora, lo que explicaría la ausencia de pigmentos de algas, sugiriendo que la falta de actividad fagocítica en la glándula digestiva derecha podría ser una característica compartida entre larvas planctotróficas de eutineuros.

En las larvas de *S. lessonii* de 5 y 6 días pos eclosión se observó alargamiento del intestino, este presenta una vuelta completa en la región dorsal, sobre el estómago larval, antes de llegar al ano, contrastando con observaciones en *S. denticulata* (Page et al., 2019) y *H. vesicula* (Heterobranchia) (Page y Ferguson, 2012). El ano se observó como una cámara al final del intestino desembocando ventralmente en la región anterior derecha de

la cavidad del manto coincidiendo con lo descrito en larvas veliger de otros gasterópodos (Bickell y Kempf, 1983; Page y Pedersen, 1998; Page y Ferguson, 2012; Page et al, 2019). Es importante señalar que el desarrollo del aparato digestivo ocurre en simultáneo a la profundización de la cavidad del manto.

El desarrollo de la concha larval o protoconcha tipo II en *S. lessonii* por secreción de células asociadas al pliegue del manto (Kniprath, 1981) ocurrió en en post-eclosión larval, coincidiendo con el inicio de la alimentación de la veliger con microalgas planctónicas, definiendo el estadio planctotrófico larval. Esta relación también fue observada en otras especies de gasterópodos marinos (Lima y Lutz, 1990).

La hidrofobicidad observada en la protoconcha larval de *S. lessonii* puede estar relacionada a la presencia de lípidos o proteínas no-polares en la composición de su matriz orgánica o del periostraco (Page, 2006), lo que explicaría el atrapamiento de las larvas bajo la tensión de la interfaz superficial del agua. Aunque no completamente aclarada algunos autores discurren de sus funciones (Highsmith, 1985; Cloney y Hansson, 1996). Por otro lado, algunos autores proponen que la hidrofobicidad de la protoconcha larval podría servir como variable en los análisis filogenéticos para gasterópodos, puesto que es una característica compartida entre los clados opistobranquios, pulmonados marinos y la familia Pyramidellidae (Gastropoda) (van den Biggelaar, 1996; van den Biggelaar y Haszprunar, 1996) y que además, los distingue de los grupos con presencia de protoconchas hidrofílicas, caso de vetigastropodos, patelogastrópodos y caenogastrópodos (Collin, 1997).

Rivest y Strathmann (1994) observaron el desarrollo de un complejo singular transitorio de largas ciliias en el extremo del pie rudimental de la larva del gasterópodo nerítido *Nerita picea*. Ellos registraron que esa estructura se vio experimentalmente asociada al consumo proteico de albumen en el periodo intracapsular y luego de eclosionar fue absorbida por la larva planctotrófica. La presencia de una estructura equivalente/homóloga también se observó en la punta del pie rudimental de *S. lessonii*. Sin embargo, su desarrollo fue advertido en el origen de la larva veliger temprana hasta el estadio planctotrófica.

La serie de resultados en el presente capítulo ilustran la plasticidad en los tiempos de desarrollo embrionario y larval de *S. lessonii* con relación a diferentes temperaturas, lo que coincide con observaciones *in situ* de presencia de desoves en el muelle de Villa Gesell a lo largo del periodo de colecta de muestras (ver capítulo 3). Además, la detallada descripción morfológica y estructural del desarrollo permite vincular estos datos a

aspectos evolutivos y del modo de vida de *S. lessonii* en la filogenia de Gastropoda, y en particular, de Heterobranchia.

## Capítulo 5: Conclusiones Generales

Se estudiaron aspectos de la biología reproductiva y del desarrollo de los primeros estadios de vida de *S. lessonii* en la población que habita la estructura del muelle de pesca, en la localidad de Villa Gesell.

La descripción del aparato reproductor es semejante a la hallada en otros sifonáridos. El desarrollo de ambos gametos sexuales en individuos adultos ocurrió simultáneamente en un mismo acino, confirmando que la especie presenta hermafroditismo simultáneo.

La observación de cortes histológicos de gónada, indicó que la espermatogénesis se inició a partir de la maduración de las células masculinas asociadas al epitelio de tejido acinar y posterior desarrollo de espermátidas hacia la luz del acino. En la oogenesis se observó un patrón similar de maduración con respecto a la pared del acino, si bien estos al separarse del epitelio se ubicaron en las regiones distales de la luz acinar, marcando mayor presencia en la periferia de gónada. Este proceso advirtió una diferencia entre las regiones de conclusión de la maduración para ambos gametos, posiblemente orientando una segregación previa a la evacuación de las células sexuales.

La ultraestructura de los espermatozoides es una herramienta utilizada en las descripciones filogenéticas. Aunque en el presente estudio no se logró describir las características del espermatozoide maduro, este es el primer estudio en describir la maduración del gameto masculino, siendo la estructura del espermatozoide en *S. lessonii* del tipo euespermatozoide, uno de los tipos de introesperma, característico de especies con fecundación interna.

Relacionado a la reproducción, los resultados encontrados sugieren estacionalidad en la maduración gametogénica para ambas porciones sexuales de la gónada hermafrodita y en la frecuencia de desoves. Aunque se haya observado la presencia continua de gametos maduros en la gónada, el aumento en su frecuencia en el periodo estival coincide con el aumento de la producción primaria en regiones templadas. Indicando una relación entre la disponibilidad de alimento y el desarrollo de los gametos.

La estacionalidad también se evidenció anualmente en el predominio de estadios de pos-evacuación observados en la gónada entre el fin de la primavera y verano austral, indicando los picos de desove en los meses de mayor temperatura atmosférica y de

superficie de mar. Una estrategia reproductiva que se ha mostrado exitosa para la especie dada su amplia presencia en el intermareal de la costa bonaerense, pese a que las altas temperaturas atmosféricas resulten en condiciones ambientales fisiológicamente estresantes para este organismo.

Con respecto a la maduración sexual de *S. lessonii*, esta tesis presenta para los sifonáridos el primer análisis de talla de primera madurez sexual para ambas porciones femenina y masculina. Se concluye que esta especie exhibe un corto periodo de protandria con la producción de gametos masculinos maduros previa a la maduración simultánea. Este aspecto fue debatido entre estudios reproductivos de sifonáridos que transitaban en que la característica común del grupo es el hermafroditismo simultáneo o la protandria seguida de la simultaneidad (Hodgson, 1999, Hubendick, 1978). Además, esta determinación resulta en implicaciones en estudios de comportamiento reproductivo y estrategias de apareamiento para la especie puesto que estos individuos, con presencia única de gametos masculinos maduros, solo pueden ejercer un rol sexual, lo que podría resultar en un conflicto de interés en la selección de pareja sexual.

El desarrollo embrionario y larval en *S. lessonii* se describió de tipo indirecto con la eclosión de una larva de tipo veliger planctotrófica libre nadante. Los desoves observados en laboratorio coinciden en términos generales a lo descrito para la especie, no obstante la producción de embriones en condiciones experimentales resultó sustancialmente menor que lo observado en el campo por Olivier y Penchaszadeh (1968). Los resultados relacionando el tiempo de desarrollo en dos rangos de temperatura indicaron que a una mayor temperatura el periodo desde la oviposición hasta la eclosión de la veliger libre fue menor. Sin embargo, no se hallaron diferencias en el desarrollo ontogénico. Por lo tanto, la temperatura es un factor que modularía el tiempo de desarrollo larval en *S. lessonii*.

La comparación entre los periodos de desarrollo embrionario y larval en cada estadio para los dos rangos de temperatura, fueron más cortos a mayor temperatura al inicio del desarrollo embrionario y previo a la eclosión de la veliger. Por otro lado, las tallas de crecimiento aunque no presentaron diferencias entre los estadios, apuntaron una inversión en el ritmo de crecimiento del embrión: los primeros estadios presentaron una mayor talla a 20° C de temperatura, mientras que las tallas de los estadios previos a la eclosión fueron mayores a 12° C. Este efecto podría deberse a las observaciones de campo donde *S. lessonii* desova sobre el sustrato en zonas del mediolitoral superior y supralitoral inferior, quedando la masa ovígera con los primeros estadios de desarrollo expuesta por

un periodo a condiciones atmosféricas de amplitud térmica, mientras que los estadios pos eclosión completarían su desarrollo en condiciones acuáticas. Estos resultados sugieren plasticidad en el desarrollo de los primeros estadios de vida de *S. lessonii* con relación a la temperatura.

Los resultados presentados en este trabajo contribuyen en aspectos fundamentales de la biología reproductiva y de los estadios tempranos de vida de *S. lessonii* colaborando a los conocimientos de los sifonáridos, grupo de suma importancia ecológica en el intermareal de sustratos duros, con amplia distribución global, además de clave en las elucidaciones taxonómicas y filogenéticas en la diversidad de los heterobranchios.



Dra. Juliana Gimenez  
DNI 22081215



Bach. Henrique Knack de Almeida  
DNI 94452024

## Bibliografía

Abe, N. 1940. The homing, spawning and other habits of a limpet, *Siphonaria japonica* Donovan. Science Reports of the Tohoku Imperial University, 15: 59-95.

Adami, M.L. 2008. The effects of grazing activity by the limpet *Siphonaria lessoni* Blainville, 1824 (Gastropoda) on the *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) (Bivalvia) community. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, Nueva Serie, 10: 309-317.

Ali, M. y Sreekrishnan, T.R. 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. Advances in Environmental Research, 5:175–96.

Allanson, B.R. 1959. On the systematics and distribution of the molluscan genus *Siphonaria* in South Africa. Hydrobiologia 12, 149–80.

Allanson, B.R. y Msizi, S.C. 2010. Reproduction and growth of the endangered siphonariid limpet *Siphonaria compressa* (Pulmonata: Basommatophora). Invertebrate Reproduction and Development, 3:151–161.

Anderson, W.A. y Personne, P. 1976. The molluscan spermatozoon: Dynamic aspects of its structure and function. *American Zoologist*, 16: 293–313. doi: 10.1093/icb/16.3.293

Anthes, N., David, P., Auld, J. R., Hoffer, J.N.A., Jarne, P., Koene, J. M., Kokko, H., Lorenzi, M.C., Péliissié, B., Sprenger, D., Staikou, A. y Schärer, L. 2010. Bateman gradients in hermaphrodites: an extended approach to quantify sexual selection. *American Naturalist*, 176: 249-263.

Appeltans, W., Ahyong, S.T., Anderson, G., Angel, M.V., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., Błażewicz-Paszkowycz, M., Bock, P., Boxshall, G., Boyko, C.B., Brandão, S.N., Bray, R.A., Bruce, N.L., Cairns, S.D., Chan, T.Y., Cheng, L., Collins, A.G., Cribb, T., Curini-Galletti, M., Dahdouh-Guebas, F., Davie, P.J., Dawson, M.N., De Clerck, O., Decock, W., De Grave, S., de Voogd, N.J., Domning, D.P., Emig, C.C., Erséus, C., Eschmeyer, W., Fauchald, K., Fautin, D.G., Feist, S.W., Fransen, C.H., Furuya, H., Garcia-Alvarez, O., Gerken, S., Gibson, D., Gittenberger, A., Gofas, S., Gómez-Daglio, L., Gordon, D.P., Guiry, M.D., Hernandez, F., Hoeksema, B.W., Hopcroft, R.R., Jaume, D., Kirk, P., Koedam, N., Koenemann, S., Kolb, J.B., Kristensen, R.M., Kroh, A., Lambert, G., Lazarus, D.B., Lemaitre, R., Longshaw, M., Lowry, J., Macpherson, E., Madin, L.P., Mah, C., Mapstone, G., McLaughlin, P.A., Mees, J., Meland, K., Messing, C.G., Mills, C.E., Molodtsova, T.N., Mooi, R., Neuhaus, B., Ng, P.K., Nielsen, C., Norenburg, J., Opresko, D.M., Osawa, M., Paulay, G., Perrin, W., Pilger, J.F., Poore, G.C., Pugh, P., Read, G.B., Reimer, J.D., Rius, M., Rocha, R.M., Saiz-Salinas, J.I., Scarabino, V., Schierwater, B., Schmidt-Rhaesa, A., Schnabel, K.E., Schotte, M., Schuchert, P., Schwabe, E., Segers, H., Self-Sullivan, C., Shenkar, N., Siegel, V., Sterrer, W., Stöhr, S., Swalla, B., Tasker, M.L., Thuesen, E.V., Timm, T., Todaro, M.A., Turon, X., Tyler, S., Uetz, P., van der Land, J., Vanhoorne, B., van Ofwegen, L.P., van Soest, R.W., Vanaverbeke, J., Walker-Smith, G., Walter, T.C., Warren, A., Williams,



- G.C., Wilson, S.P. y Costello, M.J.. 2012. The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology*, 22: 2189-202. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.036
- Arrighetti, F., Landro, S.M., Lambre, M.E., Penchaszadeh, P.E. y Teso, V. 2019. Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. *Marine Pollution Bulletin*, 140: 451–461. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.02.002
- Avaca, M.S., Narvarte, M. y Giménez, J. 2017 Male reproductive traits of the marine snail *Buccinanops deformis* (King, 1832), (Gastropoda: Nassariidae): size and age at maturity and sperm morphology. *Zoologischer Anzeiger*, 269: 68 – 77.
- Averbuj, A., Bigatti, G. y Penchaszadeh, P. 2010. Gametogenic cycle and size at first maturity of the Patagonic edible snail *Buccinanops cochlidium* from Argentina. *Marine Biology*, 157: 2229-2240. doi 10.1007/s00227-010-1488-3.
- Baqueiro-Cárdenas, E.R., Borabe, L., Goldaracena-Islas, C.G. y Rodríguez-Navarro, J. 2007. Mollusks and pollution: A review. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 78: 1-7.
- Bashevkin, S.M. y Pechenik, J.A. 2015 The interactive influence of temperature and salinity on larval and juvenile growth in the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 470: 78-91.
- Bastida, R., Capezzani, A. y Torti, M.R. 1971. Fouling organisms in the port of Mar del Plata (Argentina). I. *Siphonaria lessonii*: ecological and biometric aspects. *Marine Biology*, 10: 297–307.
- Berry, A.J. 1977. Gastropoda: Pulmonata. En: Giese A.C. y Pearse J.S. (eds). *Reproduction of marine invertebrates*, New York: Academic Press, 181-226.
- Berry, A.J. y Hunt, D.C. 1980. Behavior and tolerance of salinity and temperature in newborn *Littorina rudis* (maton) and the range of the species in the forth estuary. *Journal of Molluscan Studies*, 46: 55–65.
- Bickell, L.R. y Chia, F.S. 1979. Organogenesis and histogenesis in the planktotrophic veliger of *Doridella steinbergae* (Opisthobranchia: Nudibranchia). *Marine Biology*, 52: 91-313.
- Bickell, L.R., Chia, F.S. y Crawford, B.J. 1981. Morphogenesis of the digestive system during metamorphosis of the nudibranch *Doridella steinbergae* (Gastropoda): Conversion from phytoplanktivore to carnivore. *Marine Biology*, 62: 1–16. doi: 10.1007/BF00396946
- Bickell, L.R. y Kempf, S.C. 1983. Larval and metamorphic morphogenesis in the nudibranch *Melibe leonina* (Mollusca: Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*, 165:119-138. doi: 10.2307/1541359
- Bielefeld, U. y Becker, W. 1991. Embryonic development of the shell in *Biomphalaria glabrata* (Say). *International Journal of Developmental Biology*, 35:121–131

Borland, C. 1950, Ecological study of *Benhamina obliquata* (Sowerby), a *basommatophorous pulmonate* in Otago Harbour. Transactions of the New Zealand Institute, 78: 385-393.

Bouchet, P. y Rocroi, J.-P. 2005. Classification and nomenclator of Gastropod Families. Malacología. 47(1-2): 1-397.

Boukhicha, J., Ben Hassine, O.K. y Tlig-Zouari, S. 2015. On the establishment of the non-native false limpet *Siphonaria pectinata* in Tunisia: distribution, population structure and environmental relationships. Cahiers de Biologie Marine, 56: 55-64.

Branch, G.M. 1981. The biology of limpets: physical factors, energy flow, and ecological interactions. Oceanography and Marine Biology: an Annual Review, 19: 235-380.

Brito-Manzano, N., Aranda, D. y Baqueiro Cárdenas, E. 1999. Development, Growth and Survival of Larvae of the Fighting Conch *Strombus Pugilis* L. (Mollusca, Gastropoda) in the Laboratory. Bulletin of Marine Science, 64: 201-208.

Calvo Revuelta, M. 1999. Biología reproductora de tres especies de la familia vermetidae (mollusca: gastropoda) de las costas mediterráneas de la Península Ibérica. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

Chaine, A. y Angeloni, L. 2005. Size-dependent mating and gender choice in a simultaneous hermaphrodite, *Bulla gouldiana*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 59: 58-68.

Chambers, R.J. 1994. The conflict between adaptation and constraint: the case of the siphonariid limpets. Tesis doctoral, Rhodes University.

Chambers, R.J. y McQuaid, C.D. 1994a. Notes on taxonomy, spawn and larval development of South African species of the intertidal limpet *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata). Journal of Molluscan Studies, 60: 263-275. doi:10.1093/mollus/60.3.263

Chambers, R. J. y McQuaid, C.D. 1994b. A review of larval development in the intertidal limpet genus *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata). Journal of Molluscan Studies, 60: 415-423. doi:10.1093/mollus/60.4.415

Chambers, R.J., McQuaid, C.D. y Kirby, R. 1996. *Determination of genetic diversity of South African intertidal limpets* (Gastropoda: *Siphonaria*) with different reproductive modes using polyacrylamide gel electrophoresis of total cellular proteins. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 201: 1-11.

Chapman, T. 2006. Evolutionary conflicts of interest between males and females. Current Biology, 16: 744-754.

Charnov, E.L. 1979. Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76: 2480-2484.

Chen, S.-H., Xia, L.-P., Dahms, H.-U., Peng, X., y Ying, X.-P. 2015. The ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Onchidium struma* (Pulmonata: Onchidiidae) and its functional adaptation. *Italian Journal of Zoology*, 82:4, 489-498, DOI: 10.1080/11250003.2015.1062149

Chung, J., Chung, E.-Y. y Chang-Hoon, L. 2012. Gametogenic Cycle and the Number of Spawning Seasons by Quantitative Statistical Analysis, and the Size at 50% of Group Sexual Maturity in *Atrina (Servatrina) pectinata* (Bivalvia: Pinnidae) in Western Korea. *The Korean Journal of Malacology*, 28. doi: 363-375. 10.9710/kjm.2012.28.4.363.

Chung, E.Y. y Ryou, D.K. 2000. Gametogenesis and sexual maturation of the surf clam *Macra venerifermis* on the west coast of Korea. *Malacologia*, 42: 149-163.

Cledón, M., Arntz, W. y Penchaszadeh, P. 2008. Size and age at sexual maturity in *Adelomelon brasiliiana* (Neogastropoda: Volutidae) off Argentina. *Journal of The Marine Biological Association of The United Kingdom*, 88: 169-173. doi 10.1017/S002531540800012X.

Cloney, R.A. y Hansson, L.J. 1996. Ascidian larvae: the role of test cells in preventing hydrophobicity. *Acta Zoologica*, 77: 73–78. doi: 10.1111/j.1463-6395.1996.tb01253.x

Collin, R. 1997. Hydrophobic larval shells: Another character for higher level systematics of gastropods. *Journal of Molluscan Studies*, 63: 425-430. doi: 10.1093/mollus/63.3.425.

Collin, R., Kerr, K., Contolini, G. y Ochoa, I. 2017. Reproductive cycles in tropical intertidal gastropods are timed around tidal amplitude cycles. *Ecology and Evolution*, 7: 5977-5991.

Costello, D.P., Dawson, M.E., Eggers, A., Fox, M.H. y Henley, C. 1957. Methods of obtaining and handling marine eggs and embryos, *Marine Biological Laboratory*, 224–227.

Creese, R.G. 1980. Reproductive cycles and fecundities of two species of *Siphonaria* (Mollusca: Pulmonata) in South-eastern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 31:37–47.

Currie, D.R., McArthur, M.A. y Cohen, B.F. 2000. Reproduction and distribution of the invasive European fanworm *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae) in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology*, 136: 645-654.

Degnan, S. M., y Degnan, B.M. 2006. The origin of the pelagobenthic metazoan life cycle: What's sex got to do with it?. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 683–690.

Davies, J.M. 1996. The demography and ecology of the pulmonate limpet *Siphonaria zelandica* at Kaikoura, New Zealand. Christchurch: University of Canterbury, 135 p., M.Sc. thesis, Biological Sciences.

Dayrat, B., Goulding, T. y White, T. 2014. Diversity of Indo-West Pacific *Siphonaria* (Mollusca: Gastropoda: Euthyneura). *Zootaxa*, 3779: 246-76. doi. 10.11646/zootaxa.3779.2.7.

De Villiers, C.J., y Hodgson, A.N. 1987. The structure of the secondary gills of *Siphonaria capensis* (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*, 53:129–38.

Demin, S.I., Bogolyubov, D.S., Granovitch, A.I. y Mikhailova, N.A. 2020. New Data on Spermatogenic Cyst Formation and Cellular Composition of the Testis in a Marine Gastropod, *Littorina saxatilis*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 11: 3792. <https://doi.org/10.3390/ijms21113792>

Deschaseaux, E., Taylor, A. y Maher, W. 2011. Measure of stress response induced by temperature and salinity changes on hatched larvae of three marine gastropod species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397: 121-128. doi: 10.1016/j.jembe.2010.11.023.

Dictus, W.J.A.G. y Damen, P. 1997. Cell- lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgate* (Mollusca). *Mech. Dev.* 62: 213-226.

Di Giorgio, G., Gilardoni, C. y Ituarte, C. 2014. Pathology of Haplosporidium patagon affecting siphonariid gastropods in Patagonia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 112: 59–67. doi:10.3354/dao02798

Dinapoli, A. y Klussmann-Kolb, A. 2010. The long way to diversity - Phylogeny and evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 60-76. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.09.019

Enriquez-Díaz, M.R., Volland, J.M., Chavez-Villegas, J. F., Aldana-Aranda, D. y Gros, O. 2015. Development of the planktotrophic veligers and plantigrades of *Strombus pugilis* (Gastropoda). *Journal of Molluscan Studies*, 81: 335–344. doi: 0.1093/mollus/eyv011

Erwin, D.H. 2015. Novelty and innovation in the history of life. *Current Biology*, 25: 930–940.

Erwin, D.H. 2017. The topology of evolutionary novelty and innovation in macroevolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 372, 20160422.

Fischer, J., Phillips, N.E. 2014. Carry-over effects of multiple stressors on benthic embryos are mediated by larval exposure to elevated UVB and temperature. *Global Change Biology*, 20: 2108-2116. doi: 10.1111/gcb.12472

Gamil, I.S. 2013. Spermatogenesis and Sperm Ultrastructure in the Land Slug *Limax flavus* (Gastropoda, Pulmonata) from Egypt. *Advances in Biological Research*, 7: 253-265. doi: 10.5829/idosi.abr.2013.7.6.

Ghiselin, M. T. 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *The Quarterly Review of Biology*. 44: 189–208. doi:10. 1086/406066

Ghiselin, M. T. 1987. Species concepts, individuality, and objectivity. *Biol Philos* 2, 127–143 (1987). <https://doi.org/10.1007/BF00057958>

Gibson, G.D. 2003. Larval Development and Metamorphosis in *Pleurobranchaea maculata*, With a Review of Development in the Notaspidea (Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*, 205:121-32. doi: 10.2307/1543233.

Giese, A.C. y Pearse, J.S. 1974. Introduction: General principles. In: Giese, A.C. and Pearse J.S., eds. *Reproduction of marine invertebrates*, 1:1–49. New York: Academic Press chap.

Gilbert, S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. The Early Development of Snails. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10074/>

Giménez, J. y Penchaszadeh, P.E. 2003. Size at first sexual maturity in *Zidona dufresnei* (Caenogastropoda: Volutidae) of the Southwestern Atlantic Ocean (Mar del Plata, Argentina). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83: 293-296.

Giribet, G. y Kawauchi, G. 2015. How many species of *Siphonaria pectinata* (Gastropoda: Heterobranchia) are there? *Journal of Molluscan Studies*, 82. eyv038. doi: 10.1093/mollus/eyv038.

Golding, R. E., Byrne M., Ponder, W. F. 2008. Novel copulatory structures and reproductive functions in Amphiboloidea (Gastropoda, Heterobranchia, Pulmonata). *Invertebrate Biology* 127(2): 168–180. DOI: 10.1111/j.1744-7410.2007.00120.x

Gómez, B. J. 2001. Structure and functioning of the reproductive system. Pp. 307-330 in G. M. Barker, ed. *The biology of terrestrial molluscs*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon.

González-Wevar, C., Hüne, M., Rosenfeld, S., Nakano, T., Saucède, T., Spencer, H. y Poulin, E. 2018. Systematic revision of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) based on a complete phylogeny of the genus, with the description of a new species from the southern tip of South America. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1-34. 10.1093/zoolinnean/zly067/5245194.

Grahame, J. y Branch, G.M. 1985. Reproductive patterns of marine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 23: 373-398.

Grantham, B.A., Eckert, G.L. y Shanks, A.L. 2003. Dispersal potential of marine invertebrates in diverse habitats. *Ecological Applications Supplement: The Science of Marine Reserves*, 13:108-116.

Gray, D.R. y Hodgson, A.N. 1997. Temporal variation in foraging behaviour of *Patella granularis* and (Patellogastropoda) and *Siphonaria concinna* (Basommatophora) on a South African shore. *Journal of Molluscan Studies*, 63:121-130.

Güller, M., Zelaya, D.G. y Ituarte, C. 2016. How many *Siphonaria* species (Gastropoda: Euthyneura) live in southern South America?. *Journal of Molluscan Studies*, 82:80-96.

- Hadfield, M.G., Carpizo-Ituarte, E.J., Carmen, K y Nedved, B.T. 2001. Metamorphic Competence, a Major Adaptive Convergence in Marine Invertebrate Larvae, *American Zoologist*, 41: 1123–1131. doi: 10.1093/icb/41.5.1123
- Hamdoun A. y Epel D. 2007. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 1745-1750. doi: 10.1073/pnas.0610108104
- Haszprunar, G. 1985a. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. Part 1: Gastropoda- Prosobranchia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, 307: 457–496.
- Haszprunar, G. 1985b. The Heterobranchia- a new concept of the phylogeny and evolution of the higher Gastropoda. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforsch*, 23: 15–37.
- Haszprunar, G. 1988. Anatomy and affinities of pseudococculinid limpets (Mollusca, Archaeogastropoda). *Zoologica Scripta*, 17: 161–179. doi:10.1111/j.1463-6409.1988.tb00093.x
- Haszprunar, G., Salvini-Plawen, L.V. y Rieger, R.M. 1995. Larval planktotrophy—a primitive trait in the Bilateria? *Acta Zoologica (Stockh.)*, 76: 141–154.
- Hayward, A. y Gillooly, J.F. 2011. The cost of sex: Quantifying energetic investment in reproduction in males and females. *PLoS One* 6:e16557.
- Healy, J. M. 1983b. An ultrastructural study of basommatophoran spermatozoa (Mollusca, Gastropods). *Zool. Scr.* 12: 57-66.
- Healy, J. M. y Jamieson B. G. M., 1991. Ultrastructure of spermiogenesis in the gastropod *Heliacus variegatus* (Architectonicidae) with a description of a banded periaxonemal helix.-*Mar. Biol.* 109: 67-77.
- Heath, D.J. 1977. Simultaneous hermaphroditism; cost and benefit. *Journal of Theoretical Biology*, 64(2):363-73. doi: 10.1016/0022-5193(77)90363-0.
- Heller, J. 1993. Hermaphroditism in molluscs. *Journal of the Linnean Society*, 48:19-42. doi:10.1111/j.1095-8312.1993.tb00874.x)
- Henry, J.Q., Hejzol, A., Perry, K. J. y Martindale, M.Q. 2007. Homology of ciliary bands in spiralian trochophores. *Integrative and Comparative Biology*, 47: 865–871.
- Hermann, P.M., Genereux, B. y Wildering, W.C., 2009. Evidence for age-dependent mating strategies in the simultaneous hermaphrodite snail, *Lymnaea stagnalis* (L.) *Journal of Experimental Biology*, 212:3164-3173. doi:10.1242/jeb.030031
- Highsmith, R.C. 1985. Floating and algal rafting as potential dispersal mechanisms in brooding invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 25:169–179

- Hirano, Y. e Inaba, A. 1980. *Siphonaria* (pulmonate limpet) survey of Japan. I. Observations on the behavior of *Siphonaria japonica* during breeding season. Publications of the Seto Marine Biological Laboratory, 25: 323–334.
- Hochachka, P.W. y Somero, G.N. 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, New York.
- Hodgson, A.N. y Bernard, R.T.F. 1988. A comparison of the structure of the spermatozoa and spermatogenesis of 16 species of patellid limpet (Mollusca: Gastropoda: Archaeogastropoda). Journal of morphology. 195, 2: 205-223. doi.org/10.1002/jmor.1051950207
- Hodgson, A.N., Bernard, R.T.F. y Lindley, D. 1991. Comparative spermatology of four sympatric species of *Siphonaria* (Pulmonata: Basommatophora). Journal of Molluscan Studies, 57:309-322.
- Hodgson, A.N. 1999. The biology of siphonariid limpets (Gastropoda: Pulmonata). Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 37:245-314.
- Hoegh-Guldberg, O. y Pearse, J.S. 1995. Temperature, food availability, and the development of marine invertebrate larvae. Integrative and Comparative Biology, 35:415-425.
- Horn, A.C., Achaval, A. y Zancan, D.M. 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948) (Gastropoda, Pulmonata). Brazilian Journal of Biology, 65: 459-467.
- Hubendick, B. 1946. Systematic monograph of the Patelliformia. Kungliga Svenska Vetenskapsahademiens Handlingar Tredje Serien, 23: 5–93.
- Hubendick, B. 1947. Phylogenie und Tiergeographie der Siphonariidae. Zur Kenntnis der Phylogenie in der Ordnung Basommatophora und des Ursprungs der Pulmonatengruppe. Zoologiska Bidrag Från Uppsala, 24: 1–216.
- Hubendick, B. 1978. Systematics and comparative morphology of the Basommatophora. En: Fretter, V., y Peake, J. (eds) Pulmonates Volume 2A; Systematics, Evolution and Ecology. Academic Press, London, 1–47.
- Huang, R. y Chan, B.K.K. 2000. Egg capsules and early development of *Siphonaria japonica* (Gastropoda: Pulmonata). En: Morton, B. (ed.). The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China V. Proceedings of the Tenth International Marine Biological Workshop: The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China, Hong Kong, 1998. Hong Kong: Hong Kong University Press, 129–136.
- Hyman, L.H. 1967. The Invertebrates. Volume VI. Mollusca I. Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Gastropoda. The coelomate Bilateria. McGraw-Hill, New York. 792 pp.



- Ilano, A.S., Fujinaga, K. y Nakao, S. 2003. Reproductive cycle and size at sexual maturity of the commercial whelk *Buccinum isaotakii* in Funka Bay, Hokkaido, Japan. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83:1287-1294.
- Innes, A.J., Marsden, I.D. y Wong, P.P.S. 1984. Bimodal respiration of intertidal pulmonates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77A: 441-445.
- Isla, F.I., Bértola, G.R., Farenga, M.O., Serra, S.B. y Cortizo, L.C. 1998. Villa Gesell: un desequilibrio sedimentario inducido por fijaciones de médanos. *Revista de la Asociación Argentina de Sedimentología*, 5: 41-51.
- Iwasaki, K. 1995. Foraging and spawning rhythms of the pulmonate limpet *Siphonaria sirius* (Pilsbry): switching of activity period by a diurnal forager. *Journal of Molluscan Studies*, 61: 275-88.
- Jenkins, B.W. 1981. *Siphonaria funiculata* Reeve (Siphonariidae, Pulmonata): a redescription making *S. virgulata* Hedley a geographical variant of *S. funiculata*. *Journal of the Malacological Society of Australia*, 5: 1-15.
- Jenkins, B.W. 1983. Redescriptions and relationship of *Siphonaria zelandica* Quoy and Gaimard to *S. australis* Quoy and Gaimard with a description of *S. propria* sp. nov. (Mollusca: Pulmonata: Siphonariidae). *Journal of the Malacological Society of Australia* 6, 1-35.
- Jenkins, B.W. 1984. A new siphonariid (Mollusca: Pulmonata) from southwestern Australia. *Journal of the Malacological Society of Australia*, 6: 113-123.
- Jablonski, D. 1986. Larval ecology and macroevolution in manne invertebrates. *Bulletin of Marine Science*, 39: 565-587.
- Jablonski, D. y Lutz, R.A. 1983. Larval ecology of marine benthic invertebrates: paleobiological implications. *Biological Reviews*, 58: 21-89.
- Jägersten, G. 1972. *Evolution of the Metazoan Life Cycle. A Comprehensive Theory*. Academic Press, New York. 282 pp.
- Jörger, K.M., Stöger, I., Kano, Y., Knebelsberger, T., y Schrödl, M. 2010. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 323. doi: 10.1186/1471-2148-10-
- Kemph, S.C. y Willows, A.O.D. 1977. Laboratory culture of the Nudibranch *Tritonia diomedea* bergh (Tritoniidae: Opisthobranchia) and some aspects of its behavioral development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30: 261-276. doi: 10.1016/0022-0981(77)90035-1.
- Kessel, G.M. y Phillips, N.E. 2018. Global change scenarios trigger carry-over effects across life stages and generations of the intertidal limpet, *Siphonaria australis*. *PLoS ONE*, 13: e0194645. doi:10.1371/journal.pone.0194645

- Kniprath, E. 1977. Zur Ontogenese des Schalenfeldes von *Lymnaea stagnalis*. Wilhelm Roux's Archives, 181:11–30.
- Kniprath, E. 1981. Ontogeny of the Molluscan Shell Field: a Review. *Zoologica Scripta*, 10: 61 – 79. doi:10.1111/j.1463-6409.1981.tb00485.x.
- Knox, G.A. 1955. The development of *Kerguelenella stewartiana* (Powell) (Gastropoda: Siphonariidae). *Pacific Science*, 9: 85–9.
- LaForge, N.L. y Page, L.R. 2007. Development in *Berthella californica* (Gastropoda: Opisthobranchia) with comparative observations on phylogenetically relevant larval characters among nudipleuran opisthobranchs. *Invertebrate Biology*, 126: 318–334. doi:10.1111/j.1744-7410.2007.00102.x
- Laitano, M.V. y Fernandez-Giménez, A.V. 2016. Are Mussels Always the Best Bioindicators? Comparative Study on Biochemical Responses of Three Marine Invertebrate Species to Chronic Port Pollution. *Environmental Contamination and Toxicology*, 97: 50–55. doi:10.1007/s00128-016-1839-y.
- Laitano, M.V., Barni, M.S., Costa, P.G., Cledón, M., Fillmann, G., Miglioranza, K.S.B. y Panarello, H.O. 2016. Different carbon sources affect PCB accumulation by marine bivalves. *Marine Environmental Research*, 113: 62–69. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.11.004.
- Laland, K.N., Uller, T., Feldman, M.W., Sterelny, K., Müller, G.B., Moczek, A., Jablonka, E. y Odling-Smee, J. 2015 The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proceedings of the Royal Society*, 282: 20151019. doi:10.1098/rspb.2015.1019
- Landro, S.M., Teso, V. y Arrighetti, F. 2019. Morphology of the digestive gland of the marine panpulmonate limpet *Siphonaria lessonii*: A cytological, histochemical, and ultrastructural description. *Journal of Morphology*, 280: 1475–1484. doi: 10.1002/jmor.21043
- Landro, S.M., Teso, V. y Arrighetti, F. 2021. The panpulmonate limpet *Siphonaria lessonii* Blainville, 1827 as a sentinel of contamination in coastal areas of Argentina. *Ecological Indicators*, 107075. doi:10.1016/j.ecolind.2020.107075
- Leonard, J.L. 1990. The hermaphrodite's dilemma. *Journal of Theoretical Biology* 147: 361–372.
- Leonard, J.L. 1991. Sexual conflict and the mating systems of simultaneously hermaphroditic gastropods. *American malacological bulletin*, 9:45-58.
- Levings, S.C. y Garrity, S.D. 1986. Notes on reproduction of a tropical pulmonate limpet, *Siphonaria gigas* (Sowerby). *Theveliger*, 29:86–90.
- Lima, G.M. y Lutz, R.A. 1990. The relationship of larval shell morphology to the mode of development in marine prosobranch gastropods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 70: 611-637.

- Lima, G.M. y Pechenik, J.A. 1985. The influence of temperature on growth rate and length of larval life of the gastropod, *Crepidula plana* Say. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 90: 55-71. doi: 10.1016/0022-0981(85)90074-7
- Little, C., Stirling, P., Pilkington, M. y Pilkington, J. 1985. Larval development and metamorphosis in the marine pulmonate *Amphibola crenata* (Mollusca: Pulmonata). *Journal of Zoology*, 205: 489–510. doi:10.1111/j.1469-7998.1985.tb03540.x
- Liu, J.H. 1994. Distribution and population dynamics of three populations of *Siphonaria* on rocky intertidal shores in Hong Kong. *Journal of Molluscan Studies*, 60:431–443.
- López Gappa, J. Tablado, A. y Magaldi, N.H. 1993. Seasonal changes in an intertidal community affected by sewage pollution. *Environmental Pollution*, 82:157-165.
- López Gappa, J. Tablado, A. y Magaldi, N.H. 1996. Preliminary observations on activity pattern and resting site fidelity in the pulmonate limpet *Siphonaria lessoni*. *Thalassas*, 12, 27–36.
- Lucas, A. 1965. Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. *Bulletin Biologique De La France Et De La Belgique*, 99:115-247.
- Luchtel, D. L., Martin, A. W., Deyrup-Olsen, I. y Boer, H. H. 1997. Gastropoda: Pulmonata. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (F. W. Harrison & A. J. Kohn, eds), 6B: 459-718. Wiley-Liss, New York.
- Maia, R.C., Rocha-Barreira, C.A. y Coutinho, R. 2012. Reproductive cycle and embryonic development of the gastropod *Melampus coffeus* (Linnaeus, 1758) (Ellobiidae) in the Brazilian Northeast. *Brazilian Journal of Biology*, 72: 935-943.
- Mann, T. 1984. Spermatophores: Development, Structure, Biochemical Attributes and Role in the Transfer of Spermatozoa. *Zoophysiology*, Vol. 15. Springer Verlag, Berlin.
- Mapstone, G.M. 1978. Egg capsules and early development in *Siphonaria diemenensis* (Quoy y Gaimard 1833) and *Siphonaria baconi* (Reeve 1856). *Journal of the Malacological Society of Australia*, 4: 85–92.
- Marcomini, S.C. y López, R.A. 1997. Influencia de la urbanización en la dinámica costera, Villa Gesell, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la asociación Argentina de sedimentología*, 4: 79– 96.
- Marcomini, S.C. y López, R.A. 2006. Geomorfología Costera y Explotación de Arena de Playa en la Provincia de Buenos Aires y sus Consecuencias Ambientales. *Revista Brasileira de Geomorfologia*, 7: 61-71. doi:10.20502/rbg.v7i2.79.
- Marcus, E. y Marcus, E. 1960. On *Siphonaria hispida*. Universidade de Sao Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. *Boletim de Zoologia*, 23:107-139.
- Marin, F. y Luquet, G. 2004. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3:469–492. doi:10.1016/j.crpv.2004.07.009

Marinus, S.A. 2016. Larval culture and settlement of the intertidal gastropod *Siphonaria australis*. Tesis de Maestría. New Zealand: Victoria University of Wellington, 78 p. doi: 10.13140/RG.2.2.35258.80320.

Marshall, D.J. y Mcquaid, C.D. 1991. Metabolic rate depression in a marine pulmonate snail: pre-adaptation for a terrestrial existence? *Oecologia*, 88: 274-276.

Marshall, D.J. y Mcquaid, C.D. 1992. Comparative aerial metabolism and water relations of the intertidal limpets *Patella granularis* (Mollusca: Prosobranchia) and *Siphonaria oculus* (Mollusca: Pulmonata). *Physiological Zoology*, 65:1040-1056.

Marshall, D.J., Peter, R. y Chown, S.L. 2004. Regulated bradycardia in the pulmonate limpet *Siphonaria* (Gastropoda: Mollusca) during pollutant exposure: implication for biomarker studies. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 139:309-316.

Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K. y Relyea, R.A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 20: 685-692. doi:10.1016/j.tree.2005.08.002.

Mendes, J. y Woodley, J. 2002. Timing of reproduction in *Montastraea annularis*: Relationship to environmental variables. *Marine Ecology-progress Series*, 227: 241-251. doi:10.3354/meps227241.

Morgan, M.T. 1994. Models of sexual selection in hermaphrodites, especially plants. *American Naturalist*, 44: 100-125.

Morton, J.E. 1955a. The functional morphology of the British Ellobiidae (Gastropoda: Pulmonata) with special references to the digestive and reproductive systems. *Biological Sciences*, 239: 89- 160. doi: 10.1098/rstb.1955.0007

Morton, J.E. 1955b. The evolution of the Ellobiidae with a discussion on the origin of the Pulmonata. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 125: 127–68.

Mueller, C.A., Eme, J., Manzon, R.G., Somers, C.M., Boreham, D.R. y Wilson, J.Y. 2015. Embryonic critical windows: changes in incubation temperature alter hatchling phenotype, survival and cost of development in Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Comparative Physiology B*. 185:315-31.

Müller, G.B. 2007 Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nature Reviews Genetics*, 8: 943 – 950. doi:10.1038/nrg2219

Nakadera, Y. y Koene, J.M. 2013. Reproductive strategies in hermaphroditic gastropods: conceptual and empirical approaches. *Canadian Journal of Zoology*, 91: 367-381. doi: 10.1139/cjz-2012-0272

Nakadera, Y., Swart, E.M., Maas, J.P.A., Montagne-Wajer, K., Ter Maat, A. y Koene, J.M. 2015. Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behavioral Ecology*, 26: 232–241.

Nielsen, C. 1985. Animal phylogeny in the light of the trochaea theory. *Biological Journal of the Linnean Society*, 25: 243–299.

Nuñez, J.D., Fernández Iriarte, P.J., Ocampo, E.H., Iudica, C. y Cledón, M. 2015. Deep phylogeographic divergence among populations of limpet *Siphonaria lessoni* on the east and west coasts of South America. *Marine Biology*, 162, 595–605. doi:10.1007/s00227-014-2607-3

Nuñez, J.D., Laitano, M.V. y Cledón, M. 2012. An intertidal limpet species as a bioindicator: Pollution effects reflected by shell characteristics. *Ecological Indicators*, 14: 178-183. doi:10.1016/j.ecolind.2011.07.015.

Nuñez, J.D. Ocampo, E.H., y Cledón, M. 2014. A geographic comparison of the resting site fidelity behaviour in an intertidal limpet: Correlation with biological and physical factors. *Journal of Sea Research*, 89: 23-29.

Ocaña, T.M.J. y Emson, R.H. 1999. Maturation, spawning and development in *Siphonaria pectinata* Linnaeus (Gastropoda: Pulmonata) at Gibraltar. *Journal of Molluscan Studies*, 65:185–193.

O'Connor, M.I., Bruno, J.F., Gaines, S.D., Halpern, B.S., Lester, S.E., Kinlan, B.P. y Weiss, J.M. 2007. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 1266-1271. doi: 10.1073/pnas.0603422104

Olive, P.J.W. 1992. The adaptive significance of seasonal reproduction in marine invertebrates: the importance of distinguishing between models. *Invertebrate Reproduction and Development*, 22: 165-174.

Olivier, S.R. y Penchaszadeh, P.E. 1968. Observaciones sobre la ecología y biología de *Siphonaria* (Pachysiphonaria) *lessonii* (Blainville, 1824) (Gastropoda, Siphonariidae) en el litoral rocoso de Mar del Plata. *Cahiers de Biologie Marine*, 9:469-491.

Olivier, S.R., Escofet, A., Orensanz, J.M., Pezzani, S.E., Turro, A.M. y Turro, M.E. 1966. Contribución al conocimiento de las comunidades bénticas de Mar del Plata. I. El litoral rocoso entre Playa Grande y Playa Chica. *Anales de la Comisión de Investigación Científica Provincia de Buenos Aires*, 7:185-206.

Page, L.R. 2003. Gastropod ontogenetic torsion: Developmental remnants of an ancient evolutionary change in body plan. *Journal of Experimental Zoology*, 297:11–26. doi:10.1002/jez.b.12

Page, L.R. 2009. Molluscan larvae: Pelagic juveniles or slowly metamorphosing larvae?. *Biological Bulletin*, 216:216-25. doi: 10.1086/BBLv216n3p216

Page, L.R., Ferguson, S.J. 2012. The other gastropod larvae: larval morphogenesis in a marine neritimorph. *Journal of Morphology*, 274 :412-28. doi: 10.1002/jmor.20103.

Page, L., Hildebrand, I. y Kempf, S. 2019. Siphonariid development: Quintessential euthyneuran larva with a mantle fold innovation (Gastropoda; Panpulmonata). *Journal of Morphology*, 280: 634- 653. doi: 10.1002/jmor.20971.

Page, L.R. y Pedersen, R.V.K. 1998. Transformation of Phytoplanktivorous Larvae into Predatory Carnivores during the Development of *Polinices lewisii* (Mollusca, Caenogastropoda). *Invertebrate Biology*, 117: 208-220.

Pal, P. y Hodgson, A.N. 2005. Reproductive seasonality and simultaneous hermaphroditism in two species of *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata) from the southeast coast of South Africa. *Journal of Molluscan Studies*, 71: 33–40.

Pal, P. Erlandsson, J. y Skold, M. 2006. Size-assortative mating and non-reciprocal copulation in a hermaphroditic intertidal limpet: Test of the mate availability hypothesis. *Marine Biology*, 148: 1273–1282.

Pal, P. 2007. Fine structure of reproductive glands in two primitive marine pulmonates (Basommatophora: Siphonariidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 88: 145–152.

Pechenik, J.A., 1979. Role of encapsulation in invertebrate life histories. *American Naturalist*, 114: 859-870.

Pechenik, J.A. 1984. Influence of temperature and temperature shifts on the development of chiton larvae, *Mopalia muscosa*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 7:3-12.

Pechenik, J.A., Marsdenb, I.D. y Pechenik, O. 2003. Effects of temperature, salinity, and air exposure on development of the estuarine pulmonate gastropod *Amphibola crenata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292:159-176.

Pérez-Valdés, M. y Contreras-Guzmán, R. 2016. Effect of temperature and photoperiod on the early development of nudibranch *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) under laboratory conditions. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44: 504-512. doi: 10.3856/vol44-issue3-fulltext-9

Ponder, W., Hutchings, P. y Chapman, R. 2002. Overview of the conservation of Australian marine invertebrates. Environment Australia, Canberra, Australia. 588 pp.

Ponder, W.F. y Lindberg, D.R. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119: 83-265. doi:10.1111/j.1096-3642.1997.tb00137.x

Przeslawski, R. 2004. A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Molluscan Research*, 24: 43-63 10.1071/MR04001.

Przeslawski, R., Byrne, M. y Mellin, C. 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global Change Biology*, 21: 2122–2140. doi: 10.1111/gcb.12833

- Przeslawski, R. Davis, A.R. y Benkendorff, K. 2005. Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs. *Global Change Biology*, 11:515–522.
- Purchon, R.D. 1979. *The Biology of the Mollusca*. Oxford: Pergamon Press. 560 pp
- Quinn, G.P. 1983. Spawning and egg masses of *Siphonaria tasmanica* Tenison Woods, 1876 from Victoria. *Journal of the Malacological Society of Australia*, 6:81–82.
- Quinn, G.P. 1988a. Ecology of the intertidal pulmonate limpet *Siphonaria diemenensis* Quoy et Gaimard. I. Population dynamics and availability of food. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 117:115–36.
- Quinn, G.P. 1988b. Ecology of the intertidal pulmonate limpet *Siphonaria diemenensis* Quoy et Gaimard. II. Reproductive patterns and energetics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 117:137–156.
- Ramirez-Llodra, E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in marine biology*, 43: 87-170. doi:10.1016/S0065-2881(02)43004-0.
- Ríos, C., Noziglia, C. y Guzmán, L. 1987. Desarrollo larvario de los gastrópodos *Siphonaria lessoni* (Blainville, 1824) y *Kerguelenella lateralis* (Gould, 1846) (Pulmonata: Siphonariidae) del Estrecho de Magallanes, Chile. *Anales Instituto Patagonia*, 17: 77–88.
- Rios, E.C. 2009. *Compendium of Brazilian Sea Shells*. Editora Evangraf, Porto Alegre, Brasil.
- Rivest, B.R. y Strathmann, R.R. 1994. Uptake of protein by an independently evolved transitory cell complex in encapsulated embryos of neritoidean gastropods. En: Wilson, W.W. Jr., Stricker, S.A. y Shinn, G.L. *Reproduction and Development of Marine Invertebrates*. 166-176 pp. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Rodhouse, P. y Hatfield, E. 1992. Production of soma and gonad in maturing male *Illex argentinus* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72: 293 - 300. 10.1017/S002531540003770X.
- Rouse, G.W. 1999. Trochophore concepts: Ciliary bands and the evolution of larvae in spiralian Metazoa. *Biological Journal of the Linnean Society*, 66: 411 – 464. doi 10.1111/j.1095-8312.1999.tb01920.x
- Roy, S., Chaki, K.K., Nag, T.C. y Misra, K.K. 2016. Ultrastructure of ovotestis of young and adult of a pulmonate mollusk, *Macrochlamys indica* Benson, 1832. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 4, 184–194.
- Rundle, S.D. y Spicer, J.I. 2016. Heterokairy: a significant form of developmental plasticity? *Biology Letters*, 12 20160509. doi.org/10.1098/rsbl.2016.0509
- Ruppert, E.E., Fox, R.S. y Barnes, D.R. 2004. *Invertebrate zoology: A functional evolutionary approach*. 7th edition. Brooks/Cole-Thomson. 963 pp.

Ruthensteiner, B. 1997. Homology of the pallial and pulmonary cavity of gastropods. *Journal of Molluscan Studies*, 63: 353-367.

Sarker, M.M., Nesa, B. y Jahan, M.S. 2007. Embryonic developmental ecology of freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae: Gastropoda). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 23-31.

Scharer, L., Janicke, T. y Ramm, S. A. 2015. Sexual Conflict in Hermaphrodites. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7:a017673. doi: 10.1101/cshperspect.a017673

Scheltema, R.S. 1966. Evidence for trans-Atlantic transport of gastropod larvae belonging to the genus *Cymatium*. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 11: 83-86.

Schmera, D., Pizá, J., Reinartz, E., Ursenbacher, S. y Baur, B. 2016. Breeding system, shell size and age at sexual maturity affect sperm length in stylommatophoran gastropods. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 89- doi.org/10.1186/s12862-016-0661-9.

Simone, L. y Seabra, M. 2017. Shell and body structure of the plesiomorphic pulmonate marine limpet *Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758) from Portugal (Gastropoda: Heterobranchia: Siphonariidae). *Folia Malacologica*, 25: 147-164. doi:10.12657/folmal.025.012.

Simpson, R.D. 1977. The reproduction of some littoral molluscs from Macquarie Island (Sub-Antarctic). *Marine Biology*, 44:125-42.

Slama, T., Kefi-Jaafar, F., Maatoug-Béjaoui, J., Lahbib, Y., Hermet, S., Rivera-Ingraham, G., Lignot, J. y Menif, N. 2020. The gametogenic cycle of the non-native false limpet *Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758) in the easternmost limit of its distribution range: implications for its future in the Eastern Mediterranean Basin. *Mediterranean Marine Science*, 21: 599-607. doi: 10.12681/mms.23093

Slama, T., Lahbib, Y., Vasconcelos, P., Trigui, E. y Menif, N. 2018. The alien false limpet (*Siphonaria pectinata*) in the Bizerte channel (northern Tunisia): spawning, development and growth under laboratory conditions. *Invertebrate Reproduction and Development*, 62: 109-118. <https://doi.org/10.1080/07924259.2018.1445041>.

Soldatenko, E.V. y Shatrov, A.B. 2016. Comparative sperm ultrastructure of the Planorbidae (Pulmonata: Hygrophila). *Journal of Molluscan Studies*, 82: 585-599. doi: 10.1093/mollus/eyw029

Sokal, R. y Rohlf, F. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: W.H. Freeman, 937 pp.

Son, P.W. y Chung, E.Y. 2009. Annual reproductive cycle and size at first sexual maturity of the sun and moon scallop *Amusium japonicum japonicum* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Pectinidae) in the coastal waters of jeju-do, Korea. *Malacologia*, 51(1): 119-129.

Spicer, J.I. y Burggren, W.W., 2003. Development of physiological regulatory systems: altering the timing of crucial events. *Zoology*, 106, 91-99.



- Spicer, J.I. y Rundle, S.D. 2007. Plasticity in the timing of physiological development: Physiological heterokairy — What is it, how frequent is it, and does it matter? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148: 712–719. doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.027
- Strathmann, M.F. 1987. *Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae.* University Washington Press, Seattle.
- Struck, T.H., Wey-Fabrizius, A.R., Golombek, A., Hering, L., Weigert, A., Bleidorn, C., Klebow, S. Iakovenko, N., Hausdorf, B., Petersen, M., Kück, P., Herlyn, H., y Hankeln, T. 2014. Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a noncoelomate ancestry of spiralia. *Molecular Biology and Evolution*, 31: 1833 – 1849.
- Swearer, S.E., Caselle, J.E., Lea, D.W. y Warner. R.R. 1999. Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature*, 402: 799-802.
- Switzer-Dunlap, M., y Hadfield, M.G. 1977. Observations on development, larval growth and metamorphosis of four species of Aplysiidae (Gastropoda: Opisthobranchia) in laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29: 245-261
- Tablado, A., López Gappa, J.J. y Magaldi, N.H. 1994. Growth of the pulmonate limpet *Siphonaria lessoni* (Blainville) in a rocky intertidal area affected by sewage pollution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 175:211-226.
- Tablado, A. y López Gappa, J. 2001. Morphometric diversity of the pulmonate limpet *Siphonaria lessonii* in different coastal environments. *Scientia Marina*, 65:33-41.
- Thomas, D.L. y McClintock, J.B. 1990. Embryogenesis and the effects of temperature on embryonic development, juvenile growth rates, and the onset of oviposition in the fresh-water pulmonate gastropod *Physella cubensis*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 17: 65–71. doi:10.1080/07924259.1990.9672089
- Thompson, T.E. 1967. Direct development in a nudibranch, *Cadlina laevis*, with a discussion of developmental processes in opisthobranchia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47:1–22.
- Thorson, G. 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates. *Meddr Kommr Danm Fishk-og Havunders, Ser Plankton*, 4: 1-52.
- Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews*, 25:1–45.
- Tills, O., Rundle, S.D. y Spicer, J.I. 2013. Variance in developmental event timing is greatest at low biological levels: implications for heterochrony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110:581–590.
- Todd, C.D. 1998. Larval supply and recruitment of benthic invertebrates: do larvae always disperse as much as we believe? *Hydrobiologia*, 375/376:1-21.

Tomlinson, J. 1966. The advantages of hermaphroditism and parthenogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 11, 54–58. doi:10.1016/0022-5193(66)90038-5

Torroglosa, M.E. y Giménez, J. 2010. Temporal variation in size at maturity of the snail *Zidona dufresnei* from the southwestern Atlantic Ocean after ten years of fishery exploitation. *Aquatic Biology*, 11: 163-167. doi:10.3354/ab00306.

Torroglosa, M.E. y Giménez, J. 2015. Sperm ultrastructure in two species of *Brachidontes* (Bivalvia, Mytilidae) from the south-western Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95, 5: 991-998. doi.org/10.1017/S0025315415000028

Torroglosa, M.E. y Giménez, J. 2018. Size at first maturity of *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) from the South-western Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98: 457-462

Torroglosa, M. E. y Giménez, J. 2019. Reproductive strategy of *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia: Mytiloidea) in the South-western Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99: 155-162.

Struck, T.H., Wey-Fabrizius, A.R., Golombek, A., Hering, L., Weigert, A., Bleidorn, C., Klebow, S., Iakovenko, N., Hausdorf, B., Petersen, M., Kück, P., Herlyn, H., Hankeln, T. 2014, Platyzoan Paraphyly Based on Phylogenomic Data Supports a Noncoelomate Ancestry of Spiralia. *Molecular Biology and Evolution*, 31: 1833–1849.

Underwood, A.J. 1979. The ecology of intertidal gastropods. *Advances in Marine Biology*, 16:111–210.

van den Biggelaar, J.A.M. 1993. Cleavage pattern in embryos of *Haliotis tuberculata* (Archaeogastropoda) and gastropod phylogeny. *Journal Morphology*, 216: 121-139.

van den Biggelaar, J.A.M. 1996. Cleavage pattern and mesentoblast formation in *Acanthochiton crinitus* (Polyplacophora, Mollusca). *Developmental Biology*, 174: 423-430.

van den Biggelaar, J.A.M. y Haszprunar, G. 1996. Cleavage patterns and mesentoblast formation in the Gastropoda: an evolutionary perspective. *Evolution*, 50: 1520–1540.

Verberk, W.C.E.P., Bilton, D.T., Calosi, P. y Spicer, J. I. 2011. Oxygen supply in aquatic ectotherms: Partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns. *Ecology*, 92: 1565–1572. doi: 10.1890/10-2369.1

Verdonk N.H. y van den Biggelaar, J.A.M., 1983. Early development and the formation of the germ layers. En: Wilbur, U.M., Verdonk, N.H., van den Biggelaar, J.A.M., y Tompa, A.S. (eds). *The Mollusca*, vol 3. Academic Press, New York, pp 91–123.

Voss, N.A. 1959. Studies on the pulmonate gastropod *Siphonaria pectinata* (Linnaeus) from the southeast coast of Florida. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*, 9:84–99.

Wang, W., Ding, M., Li, X., Wang, J. y Dong, Y. 2017. Divergent thermal sensitivities among different life stages of the pulmonate limpet *Siphonaria japonica*. *Marine biology*, 164, 125. doi: 10.1007/s00227-017-3157-2

Watt, J. y Aiken, R. 2003. Effect of temperature on development time in egg masses of the intertidal Nudibranch, *Dendronotus frondosus* (Ascanius, 1774) (Opisthobranchia, Dendronotacea). *Northeast. Nat.*, 10(1): 17-24.

Whitehill, E. 2012. The Effects of Temperature on Energy Utilization by Marine Invertebrate Larvae. Tesis de Doctorado. Dissertaton, Clemson University, Clemson, SC.

Wourms, J.P. 1987. Oogenesis. En: Giese, A. C., Pearse, J. S. y Pearse, V. B. (eds) *Reproduction of Marine Invertebrates*. Blackwell Scientific Publications, California, 9: 50–178.

Ying, X.P., Sun, S.A. y Chen, M.Y. 2008. Structure of spermatozoa of *Onchidium struma*. *Acta Zoologica Sinica* 54:372–382.

Yonge, C.M. 1952. The mantle cavity of *Siphonaria alternata* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 29: 190–99.

Young, C.M. 2002. A brief history and some fundamentals. In: Young, C.M (ed) *Atlas of marine invertebrate larvae*. Academic Press, San Diego, CA, 20 pp.

Zabala, S., Averbuj, A., Penchaszadeh, P. E. y Bigatti, G. 2018. Early development of the limpet *Siphonaria lessonii* (Blainville, 1827) in populations affected by different physical stress. *Marine Biology Research*, 14: 148–157.

Zimmerman, K. y Pechenik, J. 1991. How Do Temperature and Salinity Affect Relative Rates of Growth, Morphological Differentiation, and Time to Metamorphic Competence in Larvae of the Marine Gastropod *Crepidula plana*? *Biological Bulletin*, 180: 372-386. doi: 10.2307/1542338.

Zischke, J.A. 1974. Spawning, development and growth in the pulmonate limpets *Siphonaria pectinata* Linnaeus, 1758 and *Siphonaria alternate* Say, 1882. *The veliger*, 16:399–404.