

TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS REPRODUCTIVOS DE *LASAEA*
(BIVALVIA, LASAEIDAE) EN LAS COSTAS PATAGÓNICAS**

Paula Stoyanoff

Directora: Dra. Estela Celia Lopretto

Co-director: Dr. HC Héctor Eliseo Zaixso



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS REPRODUCTIVOS DE *LASAEA* (BIVALVIA, LASAEIDAE)
EN LAS COSTAS PATAGÓNICAS**

Lic. Paula Stoyanoff

Directora: Dra. Estela C. Lopretto

Co-director: Dr. HC Héctor E. Zaixso

La Plata

2018

*A mis hijos Julián, Emilia y Clara
que crecieron con esta Tesis*

A Héctor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a aquellas personas e instituciones que permitieron que este trabajo de Tesis llegue a su fin.

En primer lugar, quiero agradecer a Héctor (Dr. HC Héctor Zaixso) porque además del trabajo dedicado a esta Tesis, supo transmitir toda la pasión para investigar; por todas las horas dedicadas en el lugar de trabajo y en su casa; por todos los momentos compartidos.

A la Dra. Estela Lopretto por su valiosa contribución como directora de esta Tesis.
A Julio y Alicia por el invaluable apoyo para realizar y finalizar el trabajo.

Al Instituto de Desarrollo Costero y al Departamento de Biología General y Ambiente de la UNPSJB por el uso de instalaciones y equipos para el desarrollo del trabajo.

A mis compañeros de trabajo.

A Damián, Javi, Martín, Juan Manuel, Caro por las muestras siempre que fue posible.

A Alicia Sar por las muestras de San Julián en algunos momentos.

A Susana Perales por las microalgas para alimentar a las almejas en cultivo.

A Damián por el asesoramiento estadístico y lectura del trabajo.

A Marce por los mapas y la logística para llevar a cabo los muestreos.

A las Dra. Noemí Gardenal y Dra. Marina Chiappero de la Universidad Nacional de Córdoba por el asesoramiento en técnicas moleculares.

Al equipo del Dr. Héctor Álvarez (INBIOP, CONICET-UNPSJB) por el asesoramiento y uso de equipos para las pruebas en técnicas moleculares.

Al PhD. Diarmaid Ó Foighil del *Museum of Zoology University of Michigan*, por facilitarme ejemplares australianos de *Lasaea* en calidad de préstamo.

A la Dra. Adriana Nillni (FCNyCS – UNPSJB) por la traducción de los textos en alemán.

Al Sr. Javier Fronza por la traducción de los textos en latín.

A todo el equipo del IDC por el apoyo incondicional siempre.

A mis compañeras de la cátedra de Genética y Evolución.

A mi familia

A Marce, Julián, Emilia y Clara

A mi mamá y mi papá (los abuelos)

CONTENIDOS

RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	X
INTRODUCCIÓN	
<hr/>	
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
OBJETIVOS GENERALES.....	8
HIPÓTESIS.....	8
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	9
ÁREA DE ESTUDIO	
<hr/>	
DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	12
CAPÍTULO I	
<hr/>	
ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y ANATÓMICOS DE <i>LASAEA</i> EN LA COSTA PATAGÓNICA	
INTRODUCCIÓN	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Área de estudio y muestreo	22
Procedimientos de laboratorio	23
RESULTADOS	24
Caracterización morfológica.....	24
Aspectos anatómicos relacionados con la reproducción.....	27
DISCUSIÓN.....	32
Consideraciones sobre la morfología valvar	32
Consideraciones sobre la anatomía branquial	33
CAPÍTULO II	
<hr/>	
CICLO REPRODUCTIVO DE <i>LASAEA</i> EN LA COSTA CENTRAL DEL GOLFO SAN JORGE, ARGENTINA	
INTRODUCCIÓN	37

MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Área de estudio y muestreo	40
Procedimientos de laboratorio	41
RESULTADOS	44
Descripción del ovotestis.....	44
Desarrollo del tejido ovárico.....	45
Desarrollo del tejido testicular	48
Análisis del ciclo gonadal	54
DISCUSIÓN.....	66
Consideraciones sobre la morfología de la gónada y los gametos	66
Interpretación del ciclo gonadal.....	70
CAPÍTULO III	
<hr/>	
DESARROLLO EMBRIONARIO Y FECUNDIDAD	
INTRODUCCIÓN	76
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
Área de estudio y muestreo	79
Procedimientos de laboratorio	79
Análisis de los datos	80
RESULTADOS	82
Descripción de los distintos estadios	83
Análisis del ciclo embrionario.....	87
Fecundidad.....	91
DISCUSIÓN.....	95
CAPÍTULO IV	
<hr/>	
NÚMERO CROMOSÓMICO DE <i>LASAEA</i> EN LA COSTA PATAGÓNICA	
INTRODUCCIÓN	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
Observación de cromosomas.....	106

Observación de regiones de organizadores nucleolares (Bandas NORs)....	109
Análisis estadísticos.....	110
RESULTADOS	110
Complemento cromosómico	110
NORs.....	115
DISCUSIÓN.....	116
CAPÍTULO V	
<hr/>	
DISCUSIÓN GENERAL	122
Consideraciones sobre la reproducción de <i>Lasaea miliaris</i>	123
CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFÍA	
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	133
ANEXO	
<hr/>	
UBICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>LASAEA</i> Y DESCRIPCIÓN DE ESPECIES	
Ubicación taxonómica de la superfamilia Galeommatoidea y el género <i>Lasaea</i>	157
BIBLIOGRAFÍA CITADA EN EL ANEXO	169

RESUMEN

El género *Lasaea* (Bivalvia, Lasaeidae), presenta una distribución cosmopolita y, a pesar de haber sido ampliamente estudiado en otras partes del mundo, cuenta con muy escasa información sobre su biología en las costas de América del Sur. El objetivo general de este trabajo es comprender el modo reproductivo de *Lasaea* en la costa de Patagonia argentina a partir de la morfología y anatomía de los ejemplares, en especial los aspectos relacionados con la modalidad vivípara; conocer el ciclo reproductivo en las localidades consideradas, su fecundidad y desarrollo larval. Asimismo, se propuso analizar el complemento cromosómico a fin de determinar variaciones en el nivel de ploidía y su posible relación con el mecanismo reproductivo de los ejemplares patagónicos.

Se analizó inicialmente las generalidades morfológicas y estructura de la charnela en individuos recolectados en Caleta Córdova Norte (CCN) y Km 3, ambas localidades cercanas a la ciudad de Comodoro Rivadavia, en el centro del Golfo San Jorge, a partir de imágenes tomadas con microscopio estereoscópico y microscopio electrónico de barrido (*scanning*); se compararon así con individuos de *Lasaea* de distintas localidades patagónicas, desde el Golfo San Matías hasta el Estrecho de Magallanes y Canal de Beagle, encontrando sólo diferencias en la coloración y forma general del borde. Los resultados obtenidos se contrastaron con las descripciones originales realizadas por distintos autores para diversas especies de *Lasaea*, muchas de ellas citadas inicialmente bajo otras denominaciones.

Los ejemplares de *Lasaea* analizados, corresponden a un eulamelibranquio con adaptaciones anatómicas acordes a las necesidades de incubación y consistentes con la estructura de un bivalvo del orden Veneroida con una historia de vida similar. La gónada en estos ejemplares, desarrolla como un ovotestis con una fracción masculina reducida (30 %) respecto del total; como carácter sobresaliente, se menciona la presencia de

espermatozoides biflagelados móviles; característica nueva dentro del género *Lasaea*.

A partir de la interpretación del tamaño del ovotestis maduro, se pudo distinguir un ciclo gonadal estacional con un periodo de desove y recuperación importante en los meses de verano seguido de un desove menor a comienzos del invierno. La observación de cortes histológicos, permitió ver una proliferación de ovocitos con vitelogénesis inicial durante todo el año, con máximos durante los meses de otoño-invierno. Los ovocitos con vitelogénesis avanzada presentan frecuencias máximas hacia fin de primavera y comienzo del verano, seguida por un periodo de mayor producción de nuevos ovocitos, coincidente con una emisión posterior de la gónada y su recuperación. La espermatogénesis también fue registrada durante todo el año; la frecuencia de individuos con más del 75 % del testículo ocupado por espermatozoides disminuye durante los meses de verano y en el invierno. La mayor frecuencia de espermatozoides fue coincidente con el ovario maduro con ovocitos en vitelogénesis avanzada, indicando una sincronía en la emisión de gametos femeninos y masculinos hacia la cámara suprabranquial.

Al analizar el desarrollo gonadal de *Lasaea* en la costa patagónica, si bien no se aprecia un patrón definido respecto de la temperatura, se observa el máximo desarrollo gonadal hacia fines de invierno – comienzo de primavera, luego de la recuperación pos desove dada cuando la temperatura del agua disminuye. Los ejemplares patagónicos incuban sus embriones en la cámara suprabranquial hasta liberarlos como juveniles; en los dos sitios considerados (CCN y Km 3), se observaron animales incubando durante todo el año, con valores máximos durante los meses correspondientes a fin de primavera – verano. Las tallas de primera incubación variaron entre estas localidades consideradas, siendo 1,72 mm en CCN y 2,1 mm en Km 3. La proporción de animales incubando estadios embrionarios iniciales indica una relación significativa positiva con la cantidad de horas de luz, negativa con la temperatura del agua de mar. Por su parte, en los estadios finales, además del efecto significativo de la cantidad de horas de luz, se pudo observar una relación significativa positiva de la talla.

Los ejemplares analizados de *Lasaea* en la costa del Golfo San Jorge, presentan una relación alométrica negativa entre número de embriones por animal y la talla en CCN ($14,12 \pm 4,84$ embriones por animal) e isométrica en Km 3 ($13,78 \pm 5,70$). Se observaron diferencias significativas entre localidades respecto del número de embriones en distinto estadio, pero no entre los estadios iniciales y finales de una misma localidad. Estos resultados indican una fecundidad distinta en cada localidad, sin una pérdida por mortalidad entre los embriones y juveniles próximos a ser liberados. A excepción de unos pocos casos, los embriones de una misma cohorte dentro de las branquias de un animal se encuentran en un mismo estadio de desarrollo; tanto para CCN como para Km 3, se pudo apreciar un intervalo entre los máximos de embriones iniciales y finales de aproximadamente dos a tres meses, dando idea que éste sería el tiempo de desarrollo desde un estadio de huevo o embrión incipiente hasta obtener un juvenil próximo a liberarse.

Finalmente se analizó el complemento cromosómico en cuatro localidades patagónicas, sin que se encuentren diferencias significativas. A partir del apareamiento de homólogos, fue posible distinguir un cariotipo $2n = 48+6$ conformado por tres pares de cromosomas metacéntricos, cinco pares submetacéntricos, diez pares subtlocéntricos, seis pares telocéntricos y seis cromosomas sin aparear (cromosomas B). Una técnica complementaria que permite visualizar las regiones de organizadores nucleolares (NORs) ha sido aplicada como indicadora del nivel de ploidía de las especies en estudio. Los resultados obtenidos mostraron un valor de mediana = 2 ± 1 NORs por célula, lo que indicaría que cada individuo tiene la cantidad de regiones de organizadores ribosomales acordes a un individuo diploide.

Las características analizadas de los ejemplares patagónicos analizados permiten identificarlos como *Lasaea miliaris*, especie descrita originalmente por Philippi (1845) para el Estrecho de Magallanes. Los resultados obtenidos en este trabajo a partir del análisis de gametos, ciclo gonadal y complemento cromosómico, permiten asumir que *Lasaea miliaris* (Philippi, 1845) es una especie hermafrodita simultánea, con un mecanismo reproductivo de autofertilización.

SUMMARY

The genus *Lasaea* (Bivalvia, Lasaeidae) has a cosmopolitan distribution and besides it was studied in different parts of their distribution, the information about their biology within the South American coasts is very scarce. The goal of this study is to understand the breeding biology of *Lasaea* in coastal Patagonian using morphological and anatomical techniques. We specially focused in aspects related to the brooding behavior and mechanisms of reproduction including their breeding cycle, egg production (fecundity) and larval development. We also explore the chromosome numbers in order to assess the variability on ploidy levels and relate them to the reproductive mechanism in localities from Patagonia, Argentina.

First we analyzed structural features of the shell (e.g. hinge) in individuals from Caleta Córdova Norte (CCN) and Km 3, both located next to Comodoro Rivadavia, in the center of the Golfo San Jorge, Argentina. These features were analyzed using a stereoscopic microscope and scanning microscope and then compared with *Lasaea* individuals from different locations along the Patagonian coast, from Golfo San Matías to the Strait of Magellan and the Beagle Channel finding only differences in the color and border shape of the shell. Our results differ from the ones previously described by several authors for different *Lasaea* species, which were originally described under different nominations.

The individuals analyzed correspond to an eulamelibranch with anatomical adaptations to brood embryos in the suprabranchial chamber and is consistent with other species of the Veneroida order having similar life history traits. The gonad of *Lasaea* develops as an ovotestis, with a reduced contribution of the male fraction (max 30 %) to the overall gonad. The outstanding characteristic is the presence of motile, biflagellated spermatozoa. Up today this biflagellate sperm has not been described for the genus *Lasaea*.

From the interpretation of the size of the mature ovotestis, an seasonal gonadal cycle could be distinguished. Main spawning events, with associated recovering phases, were recorded in the austral summer, while minor

spawnings were also observed during early winter. The histological analysis reveals that the ovary fraction of the ovotestis develops early vitellogenesis oocytes continuously with a peak during autumn and winter. Advanced vitellogenesis oocytes showed maximum frequencies towards late spring and early summer, followed by a period of higher production of new oocytes which is followed by an increase of gonadal size and its recovery. Spermatogenesis was also recorded along the year; the frequency of mature individuals showing higher amount of sperm (>75 %) in the testes fraction decrease during summer and winter. The highest frequency of spermatozoa was coincident with the mature ovary with oocytes in advanced vitellogenesis, indicating a synchronic emission of males and females gametes to the suprabranchial chamber.

Although a definite pattern is not found in gonadal development with respect to temperature, maximum values are observed towards the end of winter - beginning of spring, after recovery after spawning when the water temperature decreases. The analyzed specimens incubate the embryos in the suprabranchial chamber until their release as young. In the two sites considered (CCN and Km 3), brooding clams were observed throughout the year in both sites, with maximum rates during the end of spring and early summer. Size at which the individuals were brooding varied among study sites, being 1.72 mm in CCN and 2.1 mm in Km 3. The proportion of clams brooding early stages of embryos varied between sites, increased with the amount of daylight hours and decreased with sea water temperature. On the other hand, the proportion of clams brooding advanced embryonic stages increased with body size, the amount of daylight hours and also differed among sites.

The analyzed individuals of *Lasaea* in the coast of Golfo San Jorge, showed a negative allometric relationship in the log number of embryos and log body size at CCN (14.12 ± 4.84 embryos per individual) and isometric at Km 3 (13.78 ± 5.70 embryos per individual). The analysis demonstrated significant differences between study sites regarding the number of embryos in different stages, but not among early and final stages of the same study site; these results highlights a different egg production between localities, without evidence of egg/embryo loss during brooding. With some exceptions, are usually in the same developmental stage within each animal; in both sites (CCN and Km 3)

there is an time interval between maximum proportion of initial and final stages estimated in 2-3 months for both study sites, suggesting that this time would be the developmental period for an egg or embryo in early stage to become a young close to release.

Finally, no significant differences were found when analyzing the chromosome numbers of four Patagonian localities. From the homologous chromosome pairing, we could distinguished a karyotype $2n = 48+6$ containing three pairs of metacentric chromosomes, five submetacentric, ten subtelocentric pairs, six telocentric pairs, and six chromosomes without pairs (B chromosomes). We applied a complementary technique to the silver staining that allows the visualization of the nucleolar organizer regions (NORs) applied as indicator of the ploidy level of the studied species. The results showed for Patagonian species median value of $= 2 \pm 1$ NORs/cell, which indicated that each individual has the amount of regions of ribosomal organizing that correspond to a diploid individual.

The morphological features of the samples from Patagonia are similar to individuals of the species *Lasaea miliaris*, which was originally described by Philippi (1845) for the Magellan Strait.

The result of this thesis from the analysis of gametes, gonadal cycle and chromosome numbers, suggests that *Lasaea miliaris* (Philippi, 1845) is a simultaneous hermaphrodite species with evidence of self-fertilization as a breeding mechanism.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL

El filo Mollusca es uno de los más grandes y diversos grupos del reino animal, constituido por más de 100.000 especies en la actualidad, en su gran mayoría marinas. Está subdividido en siete clases, que poseen distinta organización corporal. La clase Bivalvia, también denominada Pelecypoda o Lamellibranchia, constituye el segundo grupo de moluscos más diversificado después de los gasterópodos, cuenta con unas 9.000 especies actuales reconocidas, se hallan representadas en ambientes marinos, estuarinos y de agua dulce y son de vida libre o sésiles (Ageitos de Castellanos 1994; Gosling 2003; Bieler y Mikkelsen 2006; Zelaya y Güller 2014).

Los bivalvos son en general dioicos, pudiendo encontrarse especies hermafroditas o con reversión de sexo (Ageitos de Castellanos 1994). En algunos grupos, especialmente aquellos de pequeño tamaño, las branquias o ctenidios, además de tener función para el intercambio gaseoso y captación de alimento, cumplen un importante rol en la reproducción, ya que constituyen el lugar adecuado para el desarrollo de huevos y embriones en aquellas especies incubadoras (Ageitos de Castellanos 1994; Ituarte 2009; Chaparro *et al.* 2011; Zelaya y Güller 2014; Morton 2015). Típicamente, los bivalvos tienen una primera larva ciliada de vida libre (trocófora) seguida de una larva con valvas y simetría bilateral (velíger); en algunos casos esta larva velíger puede ser planctotrófica mientras que en otros es lecitotrófica. En ocasiones los bivalvos tienen un estilo de vida como parásitos de otros invertebrados; en consecuencia manifiestan ciertas adaptaciones como la presencia de algunos dientes en la superficie de sus valvas, el pie modificado en un filamento adhesivo para sujetarse a su hospedador y sus larvas transformadas en una larva gloquidio (Ageitos de Castellanos 1994).

Los bivalvos de la superfamilia Galeommatoidea son relativamente pequeños, rara vez superan los 10 mm de largo (Dias-Passos y Domaneschi

2009) y habitan en todos los océanos y en aguas continentales (Valentich *et al.* 2013). Tienen diversos estilos de vida: algunos de vida libre, habitando entre los filamentos del biso de otros bivalvos o en pequeñas cavidades de la roca; en otros casos se pueden apreciar importantes relaciones de comensalismo y parasitismo con otros invertebrados, incluyendo equinodermos, crustáceos y anélidos (Fox *et al.* 2007; Goto *et al.* 2012; Zelaya e Ituarte 2012; Valentich *et al.* 2013). Estos bivalvos, presentan el patrón reproductivo más complejo dentro de la clase Bivalvia (Ó Foighil 1985); por lo general son hermafroditas simultáneos o consecutivos, ovovivíparos que incuban sus embriones hasta liberarlos como juveniles en la cámara suprabranquial (Ó Foighil 1985; Jespersen y Lützen 2006; Fox *et al.* 2007; Dias-Passos y Domaneschi 2009) y muestran variabilidad morfológica en los espermatozoides (Ó Foighil 1985). Esta característica incubadora fue sugerida como una especialización para un modo de vida comensal dentro del grupo (Popham 1940). Otros autores sugieren, además, que las especies que incuban sus crías hasta juveniles, presentan en general una distribución geográfica en latitudes altas y que existiría una relación directa entre el tamaño corporal pequeño de los adultos y la imposibilidad de producir larvas planctónicas (Strathmann y Strathmann 1982; Kabat 1985; Dias-Passos y Domaneschi 2009).

Dentro de la superfamilia Galeommatoidea se encuentra el género *Lasaea* (Brown, 1827) quien aparece ya en los registros fósiles del Eoceno temprano en Nueva Zelanda (Tabla A-1) y ha alcanzado en la actualidad una distribución cosmopolita (Chaván 1969). En América del Sur se han registrado fósiles del género *Lasaea* spp. para el Holoceno medio en Tierra del Fuego (Gordillo *et al.* 2005). *Lasaea* es un género gregario que puede encontrarse en altas densidades, en cavidades del sustrato o entre los filamentos bisales de otros bivalvos (Oldfield 1955; Mc Grath y Ó Foighil 1986; Davenport y Wilson, 1995). Son pequeños bivalvos intermareales (≤ 6 mm de largo en tamaño adulto), hermafroditas y con una aparente dicotomía en cuanto a los mecanismos reproductivos (sexual - asexual) (Ó Foighil 1988; Ó Foighil y Eernisse 1988; Iwasaki 1996; Altnöder y Haszprunar 2008) (Fig. 1). Las características externas de las valvas (color y tamaño) en *Lasaea* pueden

variar de acuerdo al ambiente en que se encuentre (Oldfield 1955; Ó Foighil 1986). En general, son de color rojizo y presentan un umbo prominente, la dentición de la charnela difiere entre las valvas derecha e izquierda; internamente tienen un pie largo y delgado, el sifón inhalante es anterior mientras que el exhalante tiene una posición posterior (Popham 1940; Oldfield 1955; Ballantine y Morton 1956; Morton *et al.* 1957; Morton 1960; Seed y O'Connor 1980; Ó Foighil 1985). Una descripción más detallada sobre los aspectos anatómicos y morfológicos de los individuos estudiados se verá en los siguientes capítulos.

En cuanto a la reproducción y desarrollo del grupo, la información es variada y a menudo contrapuesta. Ó Foighil (1987) sugiere un mecanismo de autofecundación para *L. subviridis* Dall 1899, en tanto otros investigadores consideran a las poblaciones europeas de *L. rubra* (Montagu 1803) y de *L. subviridis* como individuos hermafroditas simultáneos apomícticos, con una importante reducción de gametos masculinos e incubación de juveniles sin desarrollo de larva planctónica (Oldfield 1961; Beauchamp 1986; Crisp y Standen 1988; Ó Foighil 1988; Tyler-Walters y Crisp 1989; Tyler-Walters y Davenport 1990; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1991; Tyler-Walters y Hawkins 1995). Los trabajos realizados con poblaciones de *L. australis* (Lamarck 1818) recolectados en la costa sudeste de Australia, han indicado que los individuos son hermafroditas con fecundación cruzada, no incubadores, que liberan sus crías como larvas velígeres y presentan dispersión planctónica (Ó Foighil 1988; Ó Foighil 1989; Tyler-Walters y Crisp 1989; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999).

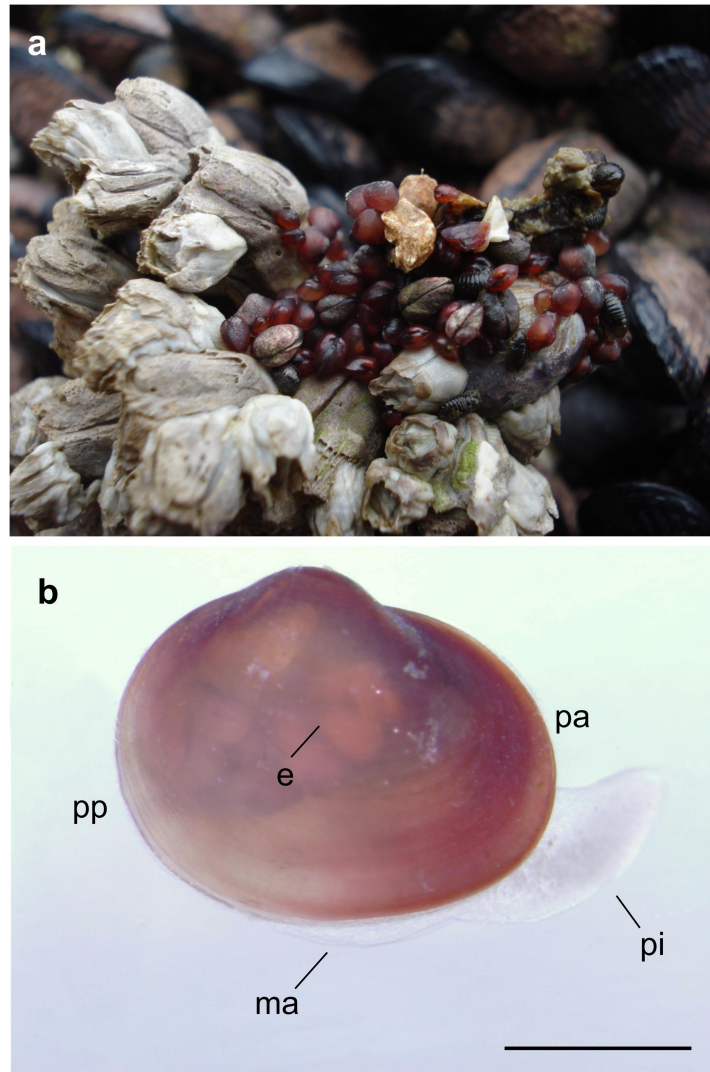


Figura 1. a) Agregado de *Lasaea* en el intermareal patagónico asociado a *Perumytilus purpuratus* y *Balanus glandula*; b) Vista de *Lasaea* patagónica incubando sus crías en la cámara suprabranquial. e: embriones; ma: manto; pa; parte anterior; pi: pie; pp: parte posterior. Escala: 1 mm.

Varios trabajos sobre citogenética llevados a cabo en diversas poblaciones de *Lasaea*, muestran complementos cromosómicos variados, con importantes niveles de ploidía en algunos casos y presencia de cromosomas supernumerarios; estos resultados se asocian a mecanismos reproductivos asexuales. Por el contrario, se encontraron números diploides en las poblaciones australianas que presentan reproducción sexual (Thiriot-Quévieux *et al.* 1988; Thiriot-Quévieux *et al.* 1989; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1991,

Thiriot-Quévieux 1992; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999). A partir de la hipótesis planteada acerca del posible mecanismo reproductivo del tipo apomítico en las poblaciones de *Lasaea*, gran parte de los trabajos posteriores se basaron en análisis de ADN, a fin de lograr una mejor interpretación de las relaciones filogenéticas del género (Ó Foighil y Eernisse 1988; Ó Foighil y Smith 1995; Ó Foighil y Smith 1996; Ó Foighil y Josefowicz 1999; Park y Ó Foighil 2000; Taylor y Ó Foighil 2000; Ó Foighil *et al.* 2001; Li *et al.* 2013). De acuerdo a Taylor y Ó Foighil (2000), las evidencias basadas en análisis de alozimas para varias poblaciones del Atlántico y Pacífico soportan la hipótesis de que, a excepción de las dos especies australianas con reproducción sexual *L. australis* y *L. colmani* (Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999), el género *Lasaea* constituye un complejo de poblaciones asexuales con marcada diversidad alélica entre ellos y prevalencia en la fijación de heterocigotos, características esperables para organismos aloploidos.

La clasificación de la superfamilia Galeommatoidea está en constante cambio (Goto *et al.* 2012). De acuerdo a estos autores, las discrepancias encontradas entre la clasificación tradicional y los resultados obtenidos a partir de la filogenia molecular, podrían deberse a que en muchos galeomátidos habrían reducido -o altamente especializado- algunos caracteres asociados al estilo de vida, situación que no se refleja en los caracteres taxonómicos. El género *Lasaea* no es una excepción y resulta taxonómicamente complejo. En su trabajo sobre evolución de la asexualidad dentro del género *Lasaea*, Ó Foighil y Smith (1995) prefirieron no asignar epíteto específico a los distintos linajes poliploides analizados, señalando entonces a *Lasaea* como un complejo de clones cosmopolita. Los análisis filogenéticos a partir de ADN nuclear y mitocondrial realizados con el fin de comparar el género *Lasaea*, tan ampliamente distribuido (Australia, Nueva Zelanda, Islas Kerguelen, Sudáfrica, Japón, Mediterráneo, Irlanda, Florida, Columbia Británica), mostraron que las poblaciones asexuales poliploides analizadas constituyen clados basales respecto de las sexuales *L. australis* y *L. colmani*, sin que se hayan encontrado hasta el momento derivados asexuales aparentes respecto de las especies sexuales australianas (incluso dentro de las poblaciones simpátridas

poliploides) (Taylor y Ó Foighil 2000). Según estos autores, sin el ancestro sexual identificado, la mayor parte de la variación genética dentro del género sigue siendo desconocida. En base a los resultados obtenidos a partir de la caracterización genética global mediante alozimas y ADNmt, los linajes poliploides predominan fuera de las costas australianas sin que haya una estructuración geográfica concordante y sin que se tenga conocimiento sobre el origen de estas poblaciones asexuales (Taylor y Ó Foighil 2000).

La información sobre el género *Lasaea* de las costas de América del Sur, se limita a referencias en catálogos taxonómicos (Philippi 1845; Stempell 1902; Melville y Standen 1914; Carcelles y Williamson 1951; Powell 1951; Soot-Ryen 1951, 1959; Dell 1964; Marincovich 1973; Ageitos de Castellanos y Landoni 1988; Pastorino 1994; Linse 1997, 1999; Guzmán *et al.* 1998; Forcelli 2000; Scarabino 2003; Zelaya 2005; Dias-Passos y Magalhães 2011) y algunas citas en publicaciones generales sobre ecología costera (Zaixso y Pastor 1977; Guzmán *et al.* 1998; Orensanz *et al.* 2002; Bertness *et al.* 2006; Cuevas *et al.* 2006; Bastida *et al.* 2007; Cabezas *et al.* 2007; Kelaher *et al.* 2007; López-Gappa y Sueiro 2007; Martin *et al.* 2015; Zaixso *et al.* 2015). No existen publicaciones que aporten datos sobre la biología de este género para las costas sudamericanas (Pacífico, Atlántico e islas subantárticas).

Ante esta escasez de información detallada sobre un género de frecuente aparición en la costa patagónica, es que se ha llevado a cabo este Trabajo de Tesis con el objetivo de aportar a la comprensión de los aspectos morfológicos, anatómicos y citogenéticos relacionados con la modalidad reproductiva de sus localidades en la zona.

OBJETIVOS GENERALES

En el presente trabajo se pretende comprender el modo reproductivo de *Lasaea* (Bivalvia, Lasaeidae) en localidades de la costa de la Patagonia central a partir de:

- El estudio de la morfología y anatomía de los ejemplares patagónicos de *Lasaea*, en especial los aspectos relacionados con la modalidad vivípara de su reproducción.
- El análisis del ciclo reproductivo de los ejemplares en la costa patagónica.
- El examen del desarrollo larval y fecundidad.
- La determinación del complemento cromosómico de ejemplares patagónicos.

HIPÓTESIS

(1) De acuerdo a los antecedentes existentes, la modalidad reproductiva de *Lasaea* de la costa patagónica, podría ajustarse a alguna de las siguientes alternativas:

- Organismos diploides con reproducción sexual.
- Organismos diploides ó poliploides con reproducción asexual y con los gametos masculinos con un papel exclusivamente inductor.

(2) La población patagónicas presenta un ciclo de reproductivo sincrónico con la temperatura superficial del agua de mar.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La tesis se organizó en los siguientes seis capítulos, en los que se analizan los aspectos de la biología del género *Lasaea* en las costas patagónicas que son objetivo del presente trabajo.

Capítulo I. Aspectos morfológicos y anatómicos de *Lasaea* en costas patagónicas

Se analiza la morfología de las valvas de *Lasaea* en ejemplares patagónicos, se examinan sus estructuras características mediante la observación con microscopio estereoscópico y fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido (MEB). Se describe también en forma general la anatomía, mediante la observación de los individuos frescos bajo microscopio estereoscópico, microscopio óptico y MEB, incluyéndose la realización de cortes histológicos con especial énfasis en las estructuras adaptadas a la incubación.

Capítulo II. Ciclo reproductivo de *Lasaea* en la costa central del Golfo San Jorge, Argentina

Se compara el ciclo reproductivo de *Lasaea* en dos localidades del Golfo San Jorge durante dos años, se describen los distintos estadios y se analizan las tallas ovocitarias, la fracción masculina a partir de cortes histológicos y la variación del tamaño gonadal en general; se relacionan los cambios con la variación de la temperatura superficial del mar.

Capítulo III. Desarrollo larval y fecundidad de *Lasaea* en la costa central del Golfo San Jorge, Argentina

Se describen los distintos estadios larvales incubados en la cámara suprabranquial; se analiza la fecundidad real y realizada y se analiza la talla de la primera madurez de incubación.

Capítulo IV. Número cromosómico de *Lasaea* en la costa de Patagonia

Se analiza el complemento cromosómico de *Lasaea* en distintas localidades de la costa patagónica con el objetivo de poder determinar el número de cromosomas, considerando la hipótesis de que el nivel de ploidía y número de cromosomas puede tener relación con el mecanismo reproductivo. Se comparan también los resultados obtenidos con los reportados para distintas especies de *Lasaea* en distintas partes del mundo.

Capítulo V. Discusión general y conclusiones

Se realiza una discusión general y conclusiones finales pertinentes a partir de los resultados obtenidos en los temas abordados, con el fin de aportar al conocimiento de los mecanismos reproductivos de los ejemplares de *Lasaea* en las costas patagónicas y lograr un enfoque actual de su ubicación taxonómica. Se explicitan posibles temas de investigación que permitan continuar con el estudio del género *Lasaea* en nuestras costas.

Anexo . Ubicación taxonómica del género *Lasaea* y descripción de especies

Se realiza una revisión sistemática a partir de las descripciones originales del género *Lasaea*, las sinonimias y la nomenclatura aceptada actualmente, con énfasis en las especies descritas y citadas para América del Sur; esta revisión permitirá actualizar el conocimiento de la situación taxonómica actual del género con el fin de ubicar a los ejemplares patagónicos en ese contexto.

ÁREA DE ESTUDIO

ÁREA DE ESTUDIO

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

En el presente trabajo los análisis de reproducción de *Lasaea* en las costas patagónicas se centran en la región central del Golfo San Jorge.

El Golfo San Jorge es la mayor cuenca semi-abierta del océano Atlántico Sudoccidental con un área cercana a los 40.000 km² con una extensión de costa cercana a los 500 km y profundidades máximas de 110 metros en su parte central. La cuenca se encuentra comprendida entre el cabo Dos Bahías al norte (44° 55' S y 65° 31' O) y el cabo Tres Puntas al sur (47° 12' S y 65° 44' O) (Fernández *et al.* 2005; Isla *et al.* 2002) (Fig. 2). Presenta mareas del tipo semi-diurno con características costeras del agua propias, donde la salinidad es menor a 33,2 ups. Esta peculiaridad resulta de la mezcla de aguas subantárticas provenientes de la corriente del cabo de Hornos y aguas con aportes continentales que llegan desde el estrecho de Magallanes, formando la denominada Corriente Patagónica que circula de S-N (Akselman 1996). Los valores de temperaturas extremas se dan en aguas superficiales costeras, asociados a los cambios estacionales. Las temperaturas medias para la zona central del Golfo San Jorge corresponden a 7,5 °C para el mes de julio y 16 °C para el mes de febrero (Vinuesa 2005).

La zona costera se caracteriza por la presencia de acantilados de altura variable formados por sedimentos fosilíferos marinos del periodo Neógeno y playas fósiles cuaternarias. Las plataformas de erosión rocosas (denominadas restingas) están poco representadas, siendo más frecuentes las playas de grava y canto rodado; en ocasiones se encuentran playas arenosas. Los intermareales son en general de pendiente suave con variaciones locales en lo referido a topografía y exposición al oleaje (Isla *et al.* 2002).

El sistema litoral se puede zonificar en los pisos supralitoral, mesolitoral, infralitoral y circalitoral. El piso supralitoral corresponde a los niveles que se encuentran por encima de las mareas altas medias y nunca o rara vez quedan

sumergidos pero reciben gran cantidad de salpicaduras por el oleaje; el mesolitoral está comprendido entre los niveles medios de bajamar y pleamar; el piso infralitoral se encuentra por debajo de los niveles de bajamares medias y el circalitoral se extiende desde el límite inferior del infralitoral hasta el nivel compatible con la supervivencia de algas multicelulares (Zaixso *et al.* 2015). En general, el mesolitoral rocoso se halla cubierto principalmente por el mejillín *Perumytilus purpuratus* formando una comunidad de mitílidos denominada mejillinar, característica de la Provincia Magallánica; en ocasiones, el mejillón *Mytilus edulis platensis* puede alcanzar densidades importantes (Zaixso y Pastor 1977) (Fig. 3).

Los sitios de muestreo considerados en este trabajo de Tesis para la descripción anatómica y morfológica de las valvas en general, el análisis del ciclo reproductivo, la descripción de estadios larvales y la fecundidad, corresponden a las playas cercanas a la ciudad de Comodoro Rivadavia, en el Golfo San Jorge: Caleta Córdova Norte (45° 43' S; 67° 22' O) y playa Km 3 (45° 50' S; 67° 27' O). La descripción morfológica de las valvas, se complementó con muestras recolectadas en las localidades de Puerto Lobos (42° 0' S; 65° 4' O; Golfo San Matías); Fondeadero San Román (42°14' S; 64°22' O; Golfo San José); Punta Cuevas (42° 45' S; 65° 2' O; Golfo Nuevo); playa Belvedere (46° 2' S; 67° 36' O; Golfo San Jorge); Cabo Blanco (47°12' S; 65°44' O); Bahía San Julián (49°18' S; 67°43' O); Puerto del Hambre (53° 36' S; 70° 55' O; Estrecho de Magallanes, Chile); Bahía Ensenada (54° 50' S; 68° 29' O; Canal de Beagle). Para el análisis del complemento cromosómico se realizó un muestreo en distintas localidades de la costa patagónica con el fin de lograr una mejor comparación de los resultados: Punta Cuevas; Km 3; playa Belvedere y Puerto del Hambre (Fig. 2).

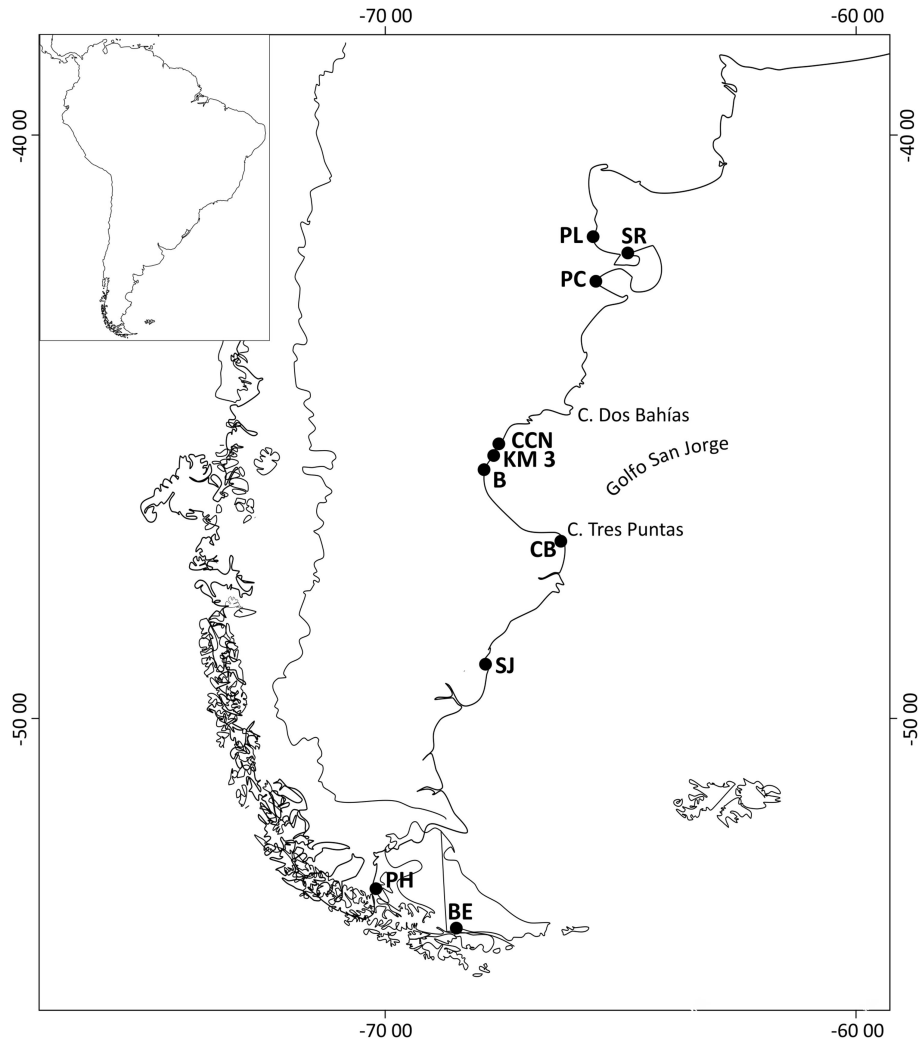


Figura 2. Ubicación de las localidades de muestreo. PL: Pto. Lobos (Golfo San Matías); SR: Fondeadero San Román (Golfo San José); PC: Pta. Cuevas (Golfo Nuevo); CCN: Caleta Córdova Norte (Golfo San Jorge); KM 3: Playa Km 3 (Golfo San Jorge); B: Playa Belvedere (Golfo San Jorge); CB: Cabo Blanco; SJ: Pto. San Julián (Bahía San Julián); PH: Puerto del Hambre (Estrecho de Magallanes – Chile); BE: Bahía Ensenada (Canal Beagle).

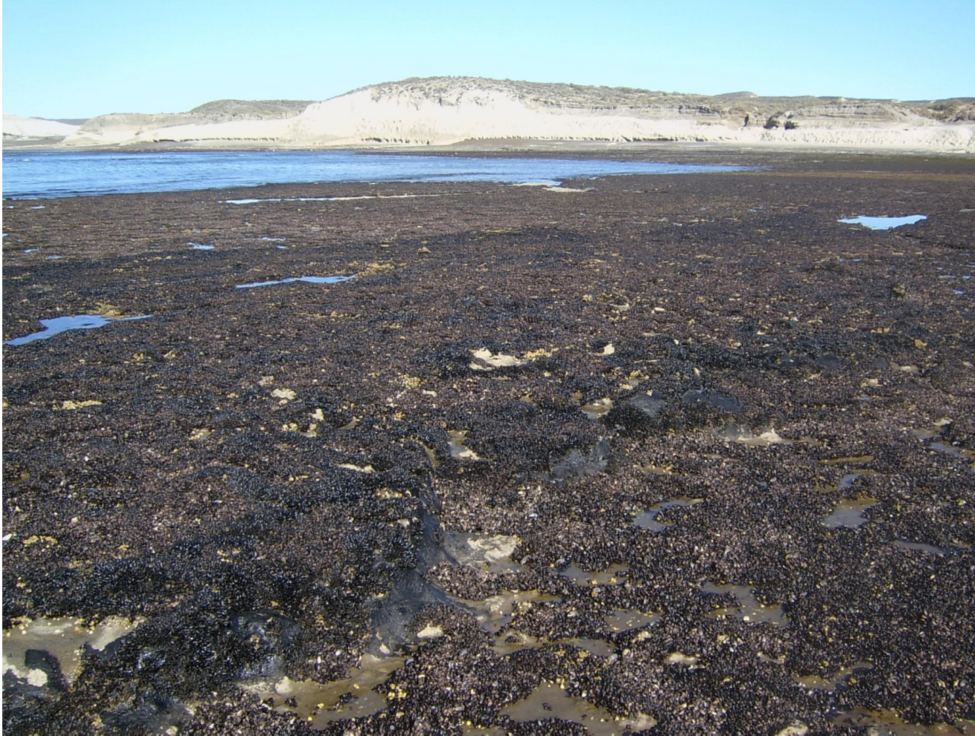


Figura 3. Mesolitoral rocoso de la playa de Caleta Córdova Norte donde se observa el mejillinar.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y ANATÓMICOS DE *LASAEA* EN LA COSTA PATAGÓNICA

INTRODUCCIÓN

Los bivalvos conforman un grupo de moluscos marinos y de agua dulce. Típicamente tienen dos valvas calcáreas recubiertas por una capa orgánica denominada periostraco, comprimidas y alargadas en sentido ántero-posterior; pueden ser iguales o subiguales determinando un plano de simetría bilateral, que se cierran por la acción de músculos aductores (Ageitos de Castellanos 1994; Gosling 2003; Camacho 2007; Zelaya y Güller 2014).

En general, la morfología de las valvas se relaciona con el modo de vida de los bivalvos; en tal sentido, en animales que viven enterrados o semienterrados las valvas son fusiformes e inequilaterales. En cambio, aquellos que viven apoyados presentan valvas equilaterales, pudiendo encontrarse tanto ejemplos de equivalvos como animales inequivalvos donde se encuentran diferencias en forma y ornamentación; este último caso es muy común en especies epifaunales, donde la valva que queda orientada hacia arriba es ligeramente distinta de la valva que queda en contacto con el sustrato (Camacho 2007; Zelaya y Güller 2014).

La articulación de las valvas se logra a través de un ligamento dorsal, generalmente externo, de estructura proteica (conquiolina) y por una charnela con dientes. En algunos casos, puede haber un ligamento interno, cuyos extremos se ubican en fosetas de la charnela (Ageitos de Castellanos 1994; Gosling 2003; Camacho 2007). Las charnelas, de carácter diagnóstico para la sistemática del grupo, se clasifican según los dientes que presentan. Siguiendo la clasificación de Camacho (2007) se pueden encontrar los siguientes tipos: (1) adonta: charnela carente por completo de dientes (presente en numerosos bivalvos fósiles); (2) taxodonta: charnela primitiva con dientes subiguales a

cada lado del umbo, alternando con surcos donde encastran los dientes de la valva opuesta, con o sin ligamiento interno; (3) actinodontas: charnela tipo taxodonta pero con dientes que divergen desde el umbo donde los más externos son casi paralelos y adyacentes al margen dorsal; (4) esquizodonta: posee pocos dientes muy fuertes, un diente triangular central más dos dientes anterior y posteriores en la valva izquierda que complementan con el espacio interdentario formado por dos dientes que divergen del umbo en la valva derecha; (5) heterodonta: el más desarrollado tipo de charnela entre los bivalvos, se caracteriza por poseer dos tipos de dientes, cardinales irradiando hacia abajo desde el umbo y divergiendo ventralmente, y laterales más largos y más o menos paralelos al ligamento, separados entre sí por concavidades que se corresponden con la valva opuesta; (6) desmodonta: presenta dientes muy pequeños atrofiados, relacionados con un ligamento interno con condróforo; (7) isodonta: sólo hay dos dientes iguales en cada valva ubicados simétricamente a los lados de un resilífero; (8) disodonta: charnela con pequeños denticulos de escasa utilidad situados debajo del umbo (Fig. 4).

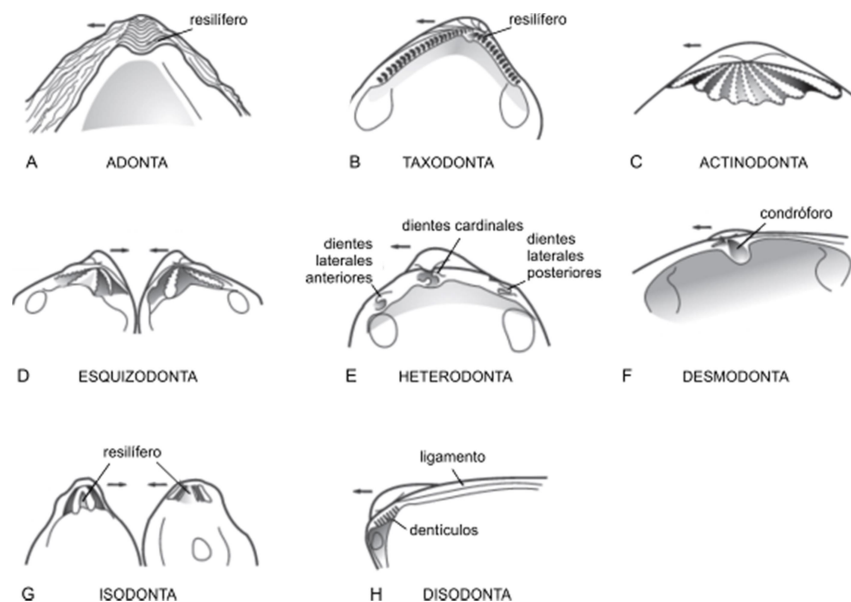


Figura 4. Tipos de charnela (modificado de Camacho 2007).

En moluscos en general, pueden hacerse inferencias sobre el modo de desarrollo en base a la morfología de la concha en las larvas; en los bivalvos, la

forma externa de la valva en estadio larval (prodisoconcha) es morfológicamente distinta en especies con desarrollo planctotrófico respecto de especies que desarrollan larvas lecitotróficas. Las especies con larvas no planctotróficas, desarrollan una prodisoconcha I relativamente grande (135-500 μm de longitud) y la prodisoconcha II se reduce o está ausente (Ó Foighil 1986).

Las partes blandas de los bivalvos se ubican en un espacio limitado por un tegumento interno (manto) formado por dos lóbulos, uno para cada valva. Las vísceras están adheridas dorsalmente al manto dejando en la parte ventral un espacio amplio (cavidad del manto ó paleal) donde se ubican también las branquias. El cuerpo, lateralmente comprimido, carece de una cabeza diferenciada como ocurre en algunos otros moluscos. La ingesta de alimentos se realiza a través de la cavidad del manto, mediante una corriente de agua inhalante que proporciona a la vez el oxígeno necesario para la respiración; otra corriente exhalante remueve los productos de desecho (Ageitos de Castellanos 1994; Gosling 2003; Camacho 2007). Los bivalvos presentan un pie muscular, dilatado, que emerge a través de la parte media de la cavidad paleal en dirección ántero-ventral y tiene una función locomotora y de excavación. Muchos bivalvos se fijan al sustrato mediante filamentos orgánicos (biso) en estadios larvales y adultos, o sólo en alguna de estas etapas (Camacho 2007).

Dentro de la cavidad paleal, entre el manto y la masa visceral, se ubican las branquias o ctenidios responsables del intercambio gaseoso; estas estructuras se componen, en general, de un eje longitudinal adyacente a la pared visceral desde donde parten en forma ventral a uno y otro lado los filamentos branquiales, ciliados e irrigados por vasos sanguíneos. Los filamentos alineados y en contacto con los cilios, forman en conjunto una laminilla branquial (lamelibranquias); en general, cada branquia, se forma por dos láminas o hemibranquias dispuestas de manera simétrica (una interna y otra externa). Las branquias presentan una morfología variable entre los distintos grupos y se clasifican en: (1) protobranquias: branquias más primitivas, sólo intervienen en la respiración, no en la captación de alimento; (2)

filibranquias: los filamentos adyacentes sólo están en contacto por los cilios, en algunos casos se observan conexiones ciliadas entre las hemibranquias ascendentes y descendentes; (3) eulamelibranquias: las hemibranquias se adhieren al manto y/o pie, presentan conexiones interlamelares vascularizadas y (4) septibranquias: presentes en bivalvos carnívoros, se caracterizan por un tabique muscular transversal perforado que divide la cavidad branquial en dos partes (Fig. 5) (Ageitos de Castellanos 1994; Camacho 2007).

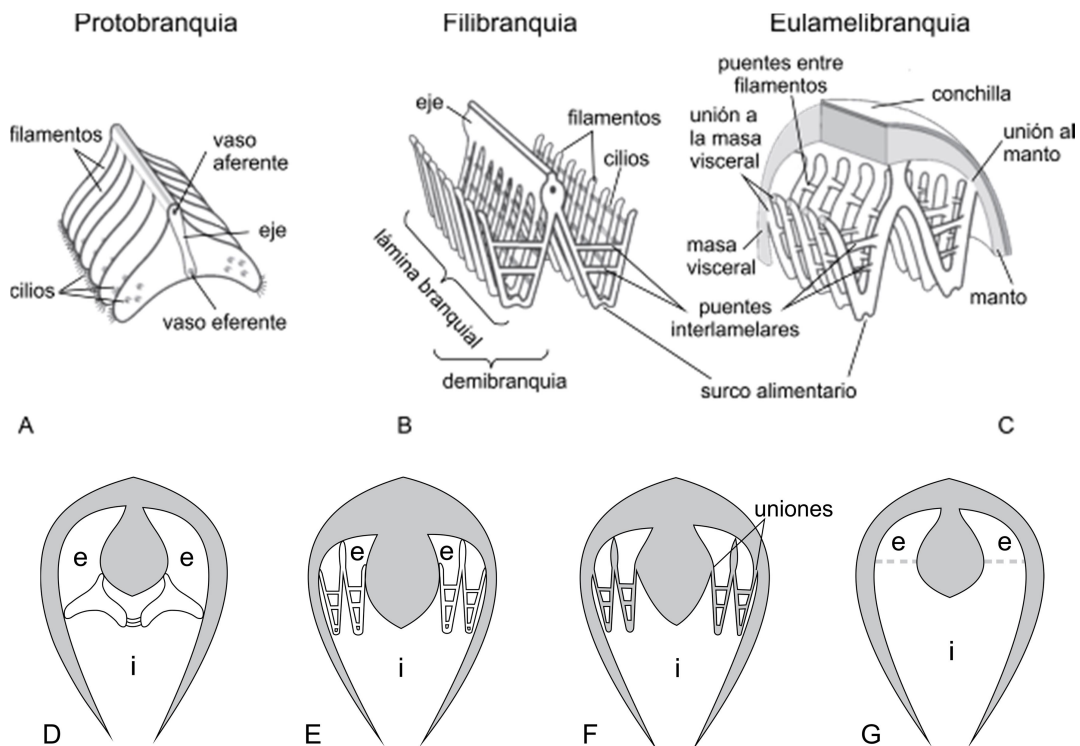


Figura 5. Tipos de branquias. A-C) esquemas simplificados de una porción de branquia de cada tipo; D-G) cortes transversales de conchilla con la parte dorsal hacia arriba mostrando la disposición de las branquias (D: protobranquia; E: filibranquia; F: eulamelibranquia; G: septibranquia). e: subcavidad exhalante; i: subcavidad inhalante de la cavidad del manto (tomado de Camacho 2007).

En varios grupos de bivalvos las branquias, además de ser las estructuras responsables en la respiración y participar en la captación de alimento, cumplen funciones en la reproducción, sirviendo como espacio de

incubación durante el desarrollo de huevos y/o embriones (Chaparro *et al.* 1993; Gallardo 1993; Ituarte 2009; Zelaya e Ituarte 2009; Zelaya y Güller 2014).

Dentro del orden Veneroida, las características anatómicas y morfológicas en general fueron estudiadas en varios géneros de agua dulce como *Sphaerium* (Lee 1999), *Corbicula* (Korniushin 2004), *Pisidium* (Korniushin y Glaubrencht 2006) y *Musculium* (Jara-Seguel *et al.* 2011) así como en representantes marinos de los géneros *Montacuta* (Popham 1940; Oldfield, 1963), *Kellia* (Popham 1940; Oldfield 1955, 1963), *Lissarca* (Richardson 1979), *Turtonia* (Oldfield 1963), *Kingiella* (Gallardo 1993) y *Mysella* (Peterson y Lützen 2008). En términos generales, en el orden Veneroida los distintos géneros presentan estructuras anatómicas semejantes; en cuanto a la morfología de las valvas, se observa una diversidad de formas distinguibles no tanto por la cantidad de caracteres, sino por la variabilidad que presentan los mismos (Mikkelsen *et al.* 2006).

Los trabajos sobre morfología y anatomía del género *Lasaea* se basan principalmente en las citas originales de los holotipos presentadas en el capítulo anterior de este trabajo (ver Anexo). Algunos trabajos posteriores amplían las descripciones sobre anatomía para *L. rubra* (Popham 1940; Oldfield 1955; 1963) y *L. subviridis* (Beauchamp 1986; Altnöder y Haszprunar 2008), y desarrollo de la prodisoconcha y charnela en *L. australis* (Ó Foighil 1988, 1989) y *L. colmani* (Ó Foighil y Thiriou-Quévieux 1999).

En lo que refiere a la charnela, Oldfield (1955) describe en la valva izquierda un pequeño diente central, un diente grande anterior frente al ligamento y un diente posterior detrás de éste; estos dientes encajan en las fosetas correspondientes de la valva derecha que tiene, a su vez, un pequeño diente delante del ligamento. Ó Foghil (1988) por su parte, sugiere una estructura de charnela equivalente dentro del género en ejemplares ampliamente distribuidos (oeste de Canadá, California, Nueva Zelanda, Japón, Gran Bretaña, Sudáfrica, Islas Seychelles en el este de África y sur de Australia) con cierta variación en el grado de desarrollo de los dientes laterales anteriores.

En cuanto a los caracteres anatómicos, Popham (1940) explica en su trabajo sobre anatomía de algunos representantes de la superfamilia Galeommatoidea, las progresivas adaptaciones en los distintos géneros para pasar de un estilo de vida libre a un modo comensal, característico de algunos bivalvos galeomátidos. En tal sentido, la autora encuentra en *Lasaea* una organización interna común a los representantes de Galeommatoidea, con características interesantes como son el cambio en la dirección del flujo de agua a través de la cavidad del manto y la estructura branquial, con una hemibranchia interna normal y completa, pero incompleta en el lado externo, conformada sólo por una lamela descendente, de aproximadamente un tercio de largo de la hemibranchia interna. Popham (1940) sugiere que la pérdida de una hemibranchia es la condición más especializada, ubicando al género *Lasaea* en una posición intermedia entre los eulamelibranquios, con una hemibranchia interna completamente desarrollada con dos lamelas (ascendente y descendente), en tanto que la hemibranchia externa presenta sólo con una lamela descendente.

El objetivo general de este capítulo es referir sintéticamente la morfología y anatomía de *Lasaea* de la costa patagónica a partir de: (1) describir los caracteres morfológicos generales; (2) describir la estructura de la charnela en los ejemplares patagónicos; (3) describir los principales caracteres anatómicos de las branquias asociados a la incubación de larvas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

Los caracteres anatómicos y morfológicos generales de *Lasaea* en la costa patagónica se describen a partir de ejemplares recolectados para tal fin en Caleta Córdova Norte (en adelante CCN) y Km 3.

Se compararon los ejemplares de *Lasaea* de la costa central del Golfo San Jorge con animales recolectados para tal fin en distintas localidades de la costa patagónica (Puerto Lobos, Golfo San Matías; Fondeadero San Román,

Golfo San José; Punta Cuevas, Golfo Nuevo; Caleta Córdova Norte, Golfo San Jorge; Km 3, Golfo San Jorge; Cabo Blanco; Puerto San Julián, Bahía San Julián; Puerto del Hambre, Estrecho de Magallanes; Bahía Ensenada, Canal Beagle) (Fig. 2, ver área de estudio).

Procedimientos de laboratorio

1. Caracterización morfológica

Se analizaron los caracteres morfológicos de la charnela en individuos adultos empleando microscopio estereoscópico. Para las observaciones, los individuos se limpiaron utilizando una solución de hipoclorito de sodio a 10 % durante 2 a 3 horas hasta eliminar todas las partes orgánicas.

A fin de lograr un mejor un mejor detalle en la conformación de la charnela, se analizaron ejemplares adultos y larvas-D (estadio previo al juvenil próximo a ser liberado) de CCN y Km 3 fotografiados con microscopio electrónico de barrido (*scanning*); las imágenes se tomaron sin metalizar. Para la identificación de los dientes de la charnela se siguió el método propuesto por Bernard y Munier-Chalmas (en Cox 1969), donde se identifica una fórmula dentaria similar a una fracción en la que el numerador indica los dientes de la valva derecha y el denominador a los de la valva izquierda, comenzando desde la parte anterior; cada término se ubica en la posición relativa que presentan los dientes entre sí. Los dientes cardinales se indican con números arábigos, comenzando siempre por el central y designando la posición anterior-posterior con letras minúsculas en orden alfabético. Los dientes laterales se designan con las letras A y P según sean anterior ó posterior y números romanos; si se trata de la valva derecha la numeración de los dientes tanto cardinales como laterales es impar, en tanto para la valva izquierda se utiliza una numeración par relativa a la valva complementaria (Camacho 2007). La fórmula dentaria típica de un bivalvo del orden Veneroida es:

dientes laterales anteriores	dientes cardinales	dientes laterales posteriores	
AI AIII	3a 1 3b	PI PIII	Valva derecha
AII	2a 2b 4b	PII	Valva izquierda

(tomado de Camacho 2007)

2. Descripción de caracteres anatómicos generales

Se realizó una descripción general de la posición interna de los órganos mediante la disección en animales recolectados en CCN y Km 3 (n=20 en cada localidad), a fin de lograr una correcta interpretación de los caracteres asociados a la incubación de larvas.

3. Descripción de caracteres branquiales como adaptaciones a la incubación

Se realizó una descripción de las branquias mediante la observación de animales vivos. Para una mejor interpretación, se observaron las estructuras ctenidiales en cortes histológicos teñidos con tricrómico de Masson (Gabe 1968); las observaciones se hicieron sobre los cortes histológicos (aproximadamente 30 individuos por mes de setiembre de 2005 a agosto de 2007) utilizados en el Cap. II. Por otra parte, se tomaron imágenes con microscopio electrónico de barrido (*scanning*) para ver en detalle la ultraestructura de las branquias; los animales fueron tratados con hexametildisilazano (HMDS) (Nation 1983; Korniushev 2004).

Los animales vivos se observaron y fotografiaron con una cámara digital OLYMPUS U-TVO 5X-C3 conectada a un microscopio estereoscópico OLYMPUS SZX16. Las fotografías de cortes histológicos se realizaron con una cámara digital OLYMPUS U-TVO 5X-C3 conectada a un microscopio OLYMPUS BX-51.

Las imágenes de microscopía electrónica se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Jeol - JSM-6510/6510LV con detector de electrones secundarios y trabajo en alto vacío.

RESULTADOS

Caracterización morfológica

Los ejemplares de *Lasaea* en la costa patagónica son equivalvos e inequilaterales (Figs. 6a y b), con una conchilla delgada, frágil, de color rojizo

con tonalidades más claras hacia el borde ventral y más intenso en la zona del umbo. El umbo ligeramente corrido hacia la parte posterior deja un lado anterior más aguzado.

La charnela es del tipo heterodonta; se distingue en la valva derecha un pequeño diente cardinal central y dos dientes cardinales anterior y posterior más conspicuos; se observan dos dientes laterales anteriores y dos posteriores, quedando entre medio en cada caso, amplias fosetas de forma ligeramente triangular donde encastrarán los dientes de la valva opuesta (Fig. 6c). En forma complementaria, en la valva izquierda se diferencian dos dientes cardinales anteriores, siendo el central más prominente, y un tercer diente cardinal posterior; hacia los lados, se pueden ver dos dientes laterales anterior y posterior de importante tamaño formando el encastre con la valva derecha (Fig. 6d).

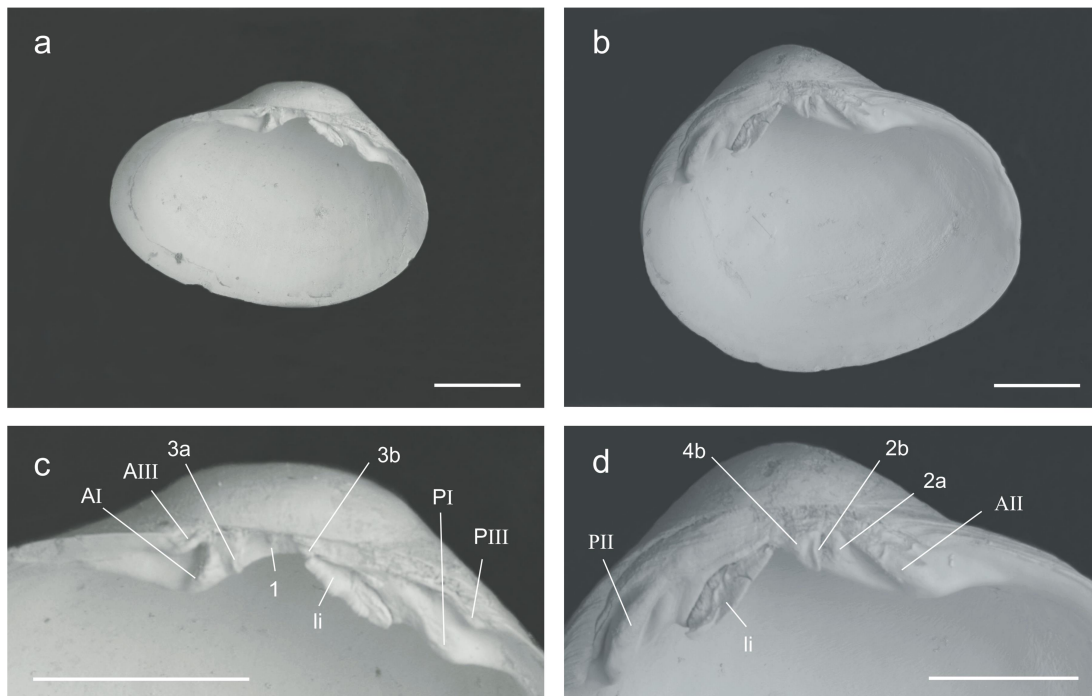


Figura 6. Valvas derecha e izquierda y detalle de las charnelas de *Lasaea* de la costa central del Golfo San Jorge. a) valva derecha; b) valva izquierda; c) detalle de charnela derecha; d) detalle de charnela izquierda. 1 y 3: dientes cardinales valva derecha (anterior y posteriores); 2 y 4: dientes cardinales valva izquierda (anteriores y posterior); A: dientes laterales anteriores (I, II y III); li: ligamento; P: dientes laterales posteriores (I, II y III). Escalas 500 μ m.

Las valvas de diferentes localidades patagónicas presentan características morfológicas semejantes a las descritas para la costa central del Golfo San Jorge (Fig. 7).

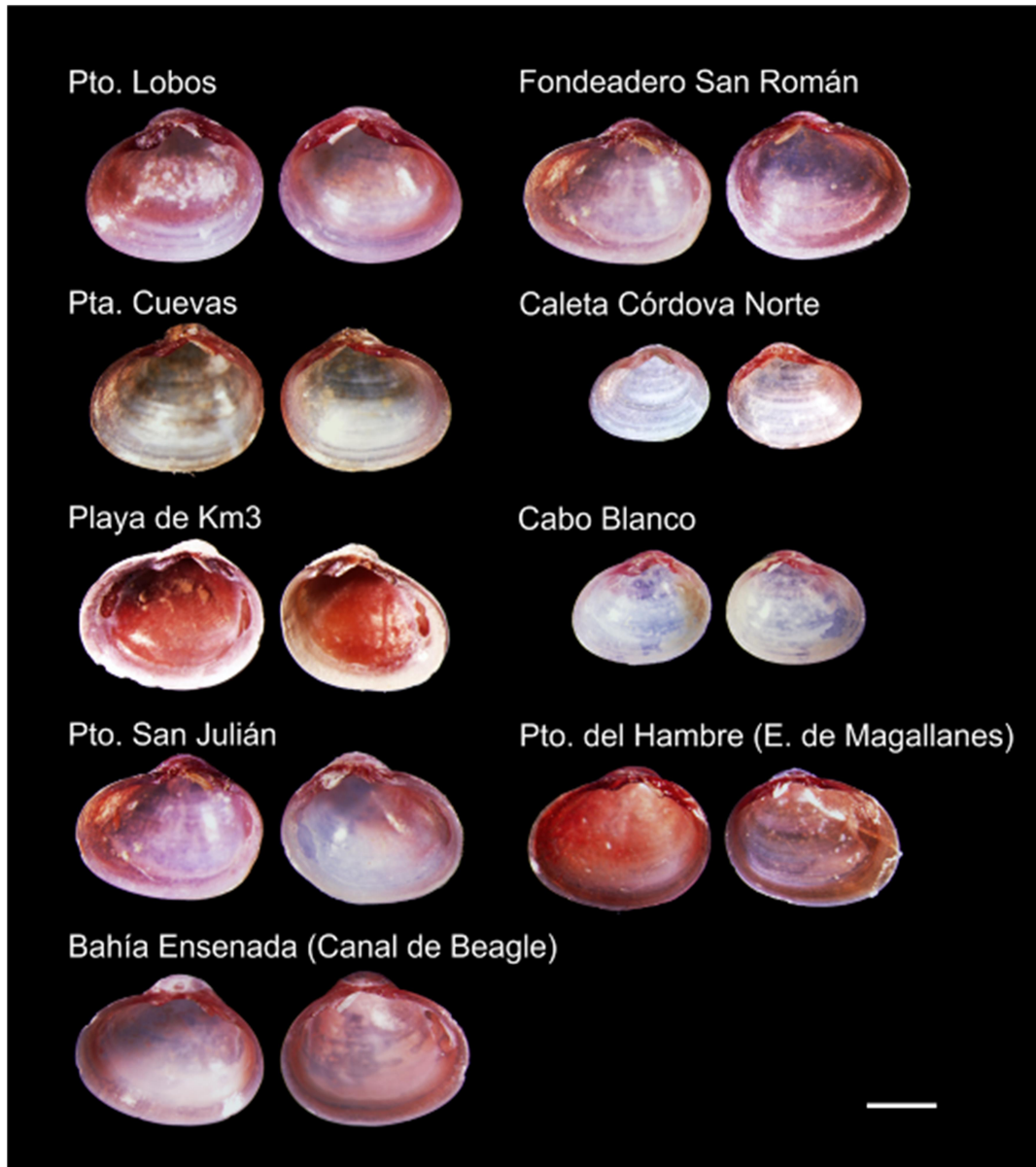


Figura 7. Valvas derecha e izquierda de ejemplares de *Lasaea* de distintas localidades patagónicas. Escala 1 mm.

Aspectos anatómicos relacionados con la reproducción

En general, se puede observar una cavidad del manto que contiene a las branquias, en forma simétrica en las valvas derecha e izquierda (Fig. 8a).

En el cuarto anterior dorsal se ubica la glándula digestiva con gran cantidad de divertículos; rodeándola es posible ver la gónada (ovotestis) de gran tamaño cuando se encuentra madura; formada por dos lóbulos (izquierdo y derecho) unidos entre sí; la gónada se ubica en la parte central cercana al umbo (Fig. 8a). Tanto el tejido ovárico como el tejido testicular presentan un aspecto general blanquecino opaco, no diferenciables en forma macroscópica. Por debajo de la gónada continúa la masa visceral (Fig. 8b); en la cavidad interna se pueden distinguir los músculos retractores del pie y del biso, los músculos aductores anterior y posterior se observan a cada lado respectivamente (Fig. 8b). En el centro y sobre el borde ventral se presenta un pie musculoso. El sifón inhalante abre sobre la parte anterior (Fig. 8c), en tanto que el exhalante lo hace en forma posterior sin sobresalir de la valva.

Las branquias, derecha e izquierda, dispuestas en posición transversal al flujo del agua, presentan una estructura del tipo eulamelibranquia, formadas por dos hemibranchias ó demibranchias externa e interna. Las hemibranchias internas forman una estructura resistente para contener a los embriones durante la incubación (Fig. 8d). En la hemibranchia externa sólo persiste la laminilla descendente y fusionada al lóbulo del manto (Figs. 9a y b). Las láminas tienen uniones diversas entre sí y entre hemibranchias opuestas (Fig. 9c). Mediante fotografías tomadas con el microscopio electrónico de barrido se pudieron registrar estas uniones de las laminillas branquiales a la masa visceral y el sifón exhalante (Fig. 10). Entre las láminas ascendentes y descendentes de la hemibranchia interna, se observa un escaso número de uniones logrando, de esta manera, una mayor cavidad para la incubación de larvas en general. Los filamentos branquiales (23 ± 6 en cada laminilla considerado para animales adultos con una talla media de 2,2 mm; n=30) presentan abundante cantidad de cilios (Fig. 10b). Las laminillas branquiales muestran abundantes uniones de tejido interfilamentares elásticas que permiten la carga de embriones en la cámara suprabranquial de la hemibranchia interna (Fig. 11).

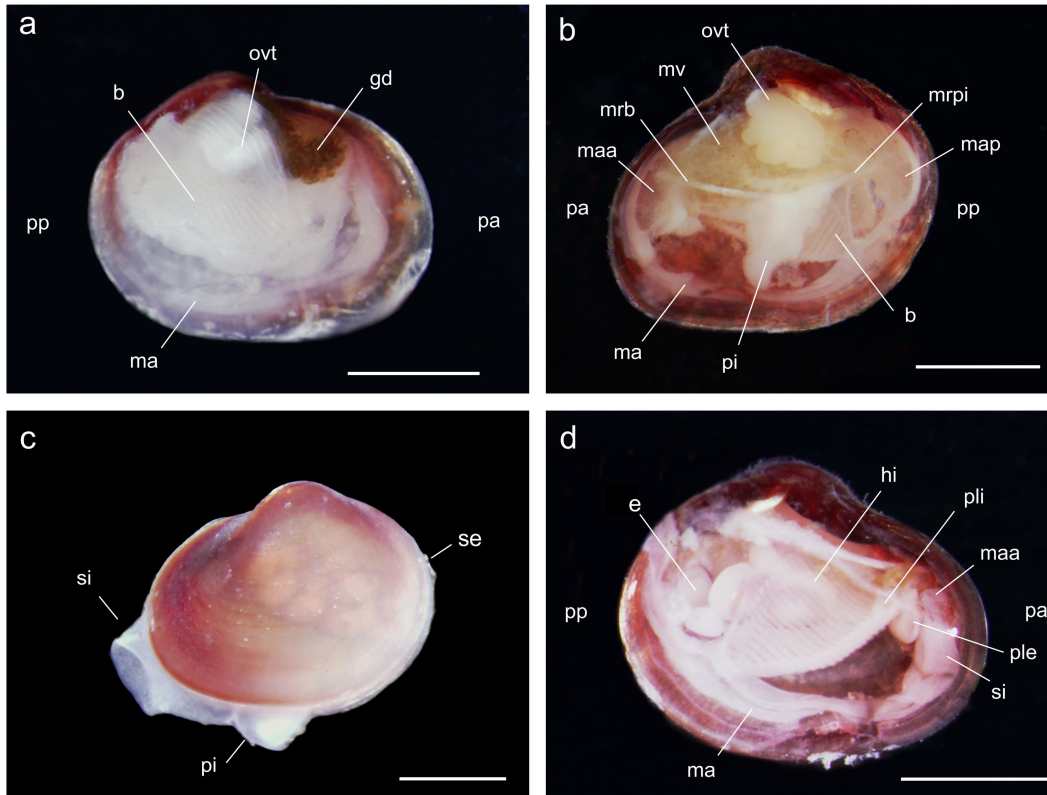


Figura 8. Disección de *Lasaea* de la costa central del Golfo San Jorge. a) branquias completas en la cavidad del manto; b) parte interna de la cavidad del manto sin branquias; c) sifón exhalante y pie distendidos; d) embriones incubados en la cámara suprabranquial. b: branquia; hi: hemibranchia interna; e: embriones; gd: glándula digestiva; li: ligamento; ma: lóbulo del manto; maa: músculo aductor anterior; map: músculo aductor posterior; mrb: músculo retractor del biso; mrpi: músculo retractor del pie; mv: masa visceral; ovt: ovotestis; pa: parte anterior; pi: pie; ple: palpo labial externo; pli: palpo labial interno; pp: parte posterior; se: sifón exhalante; si: sifón inhalante. Escalas 1 mm.

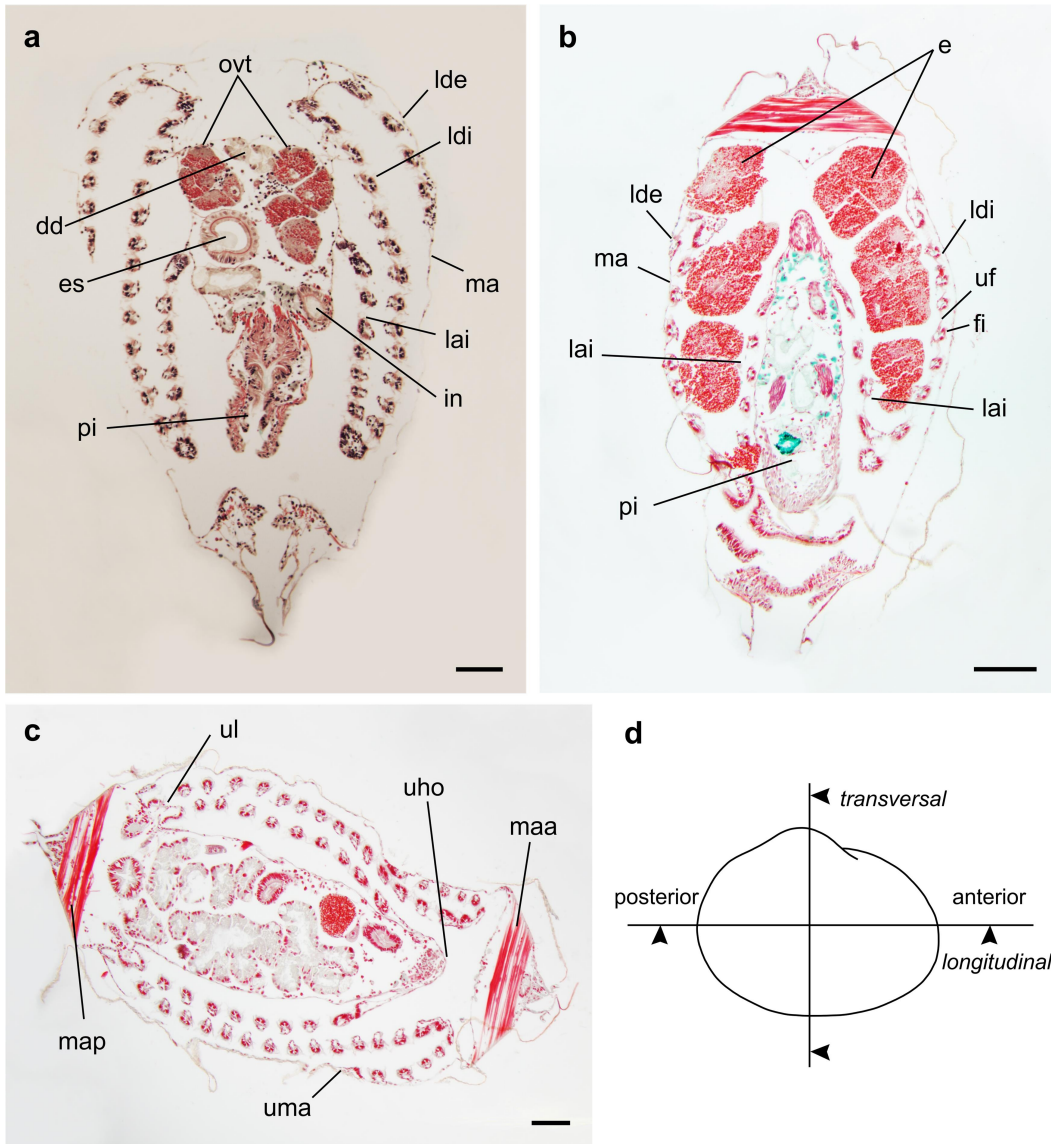


Figura 9. Cortes histológicos de *Lasaea*. a) corte transversal con la gónada madura; b) corte transversal con embriones en la cámara suprabranquial; c) corte longitudinal; d) esquema de los planos de corte. dd: divertículos digestivos; e: embriones; es: estómago; fi: filamentos branquiales; in: intestino; lai: laminilla ascendente interna; ldi: laminilla descendente interna; lde: laminilla descendente externa; ma: manto; maa: músculo aductor posterior; map: músculo aductor posterior; ovt: ovotestis; pi: pie; uf: unión inter-filamentar; uho: unión de hemibranchias opuestas; ul: unión entre láminas de la misma hemibranchia; uma: unión de lámina externa al manto. Las flechas indican los sitios de unión de las hemibranchias al manto. Escalas 100 μm .

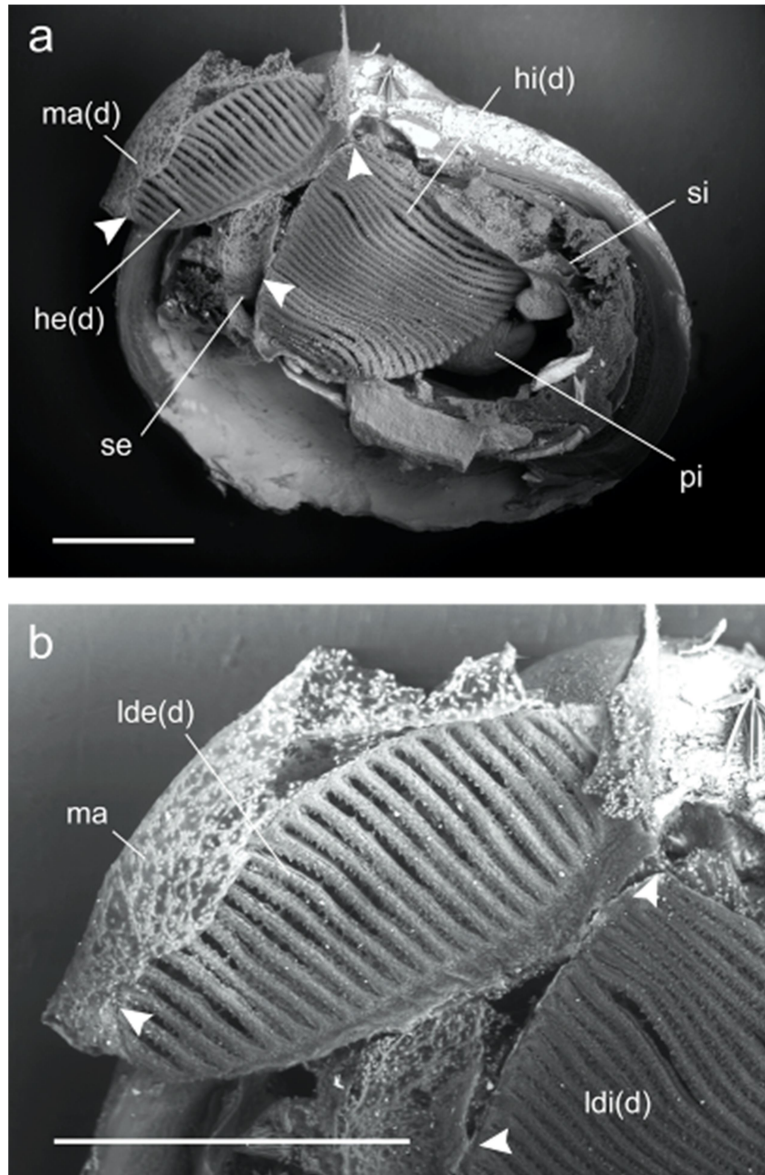


Figura 10. *Lasaea* fotografiada con MEB. a) hemibranquias interna y externa derechas; b) detalle de las laminillas descendentes interna y externa mostrando las uniones al lóbulo del manto, sifón exhalante y masa visceral. Las flechas indican los sitios de unión. he(d): hemibraquia externa derecha; hi(d): hemibranchia interna derecha; Ide(d): laminilla descendente externa derecha; Idi(d): laminilla descendente interna derecha; ma(d): lóbulo del manto derecho; pi: pie; se: sifón exhalante; si: sifón inhalante. Escalas 500 μ m.

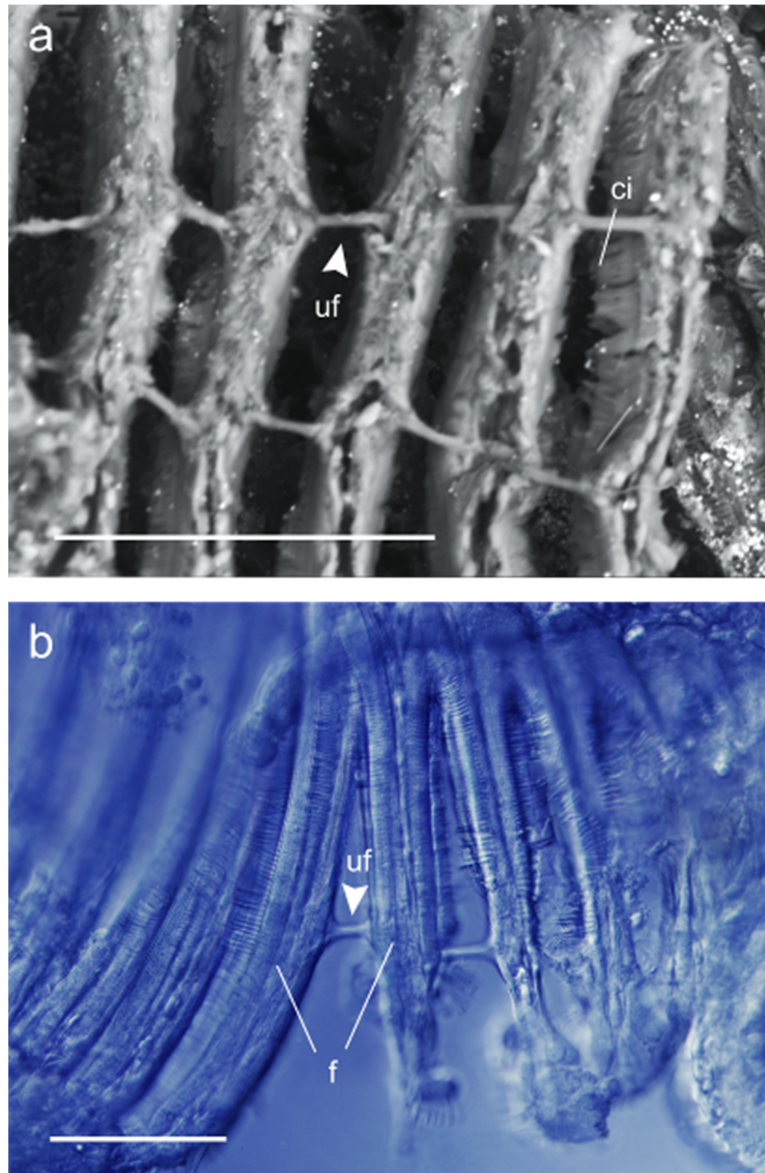


Figura 11. Detalle de las uniones inter-filamentares y la abundancia de cilios en los filamentos. a) imagen tomada con MEB; b) imagen tomada con MO. ci: cilios frontales; f: filamentos; uf: uniones interfilamentares elásticas. Escalas 100 μm .

DISCUSIÓN

Consideraciones sobre la morfología valvar

De manera tradicional, la distinción de las especies de bivalvos se basa en el reconocimiento de estructuras morfológicas características de la valva y en particular de la charnela (Dias-Passos y Domaneschi 2006). Las valvas de los representantes de la superfamilia Galeommatoidea son usualmente finas y sin demasiados caracteres específicos (Jespersen y Lützen 2006).

En su primera caracterización sobre el género *Lasaea*, Montagu (1803) describe una valva con dientes cardinales poco conspicuos y dientes laterales más prominentes. Brown (1827) se refiere a estos bivalvos como equivalvos e inequilaterales de aspecto convexo, añadiendo a la descripción original la presencia de un ligamento interno desplazado del centro. Forbes y Hanley (1853) describen con mayor detalle la dentición de *L. rubra*, indicando la presencia de un pequeño diente central y una foseta grande detrás del umbo en la valva derecha; en la valva complementaria los autores observan un pequeño diente lateral anterior y uno del tipo laminar oblicuo a la charnela, con una foseta triangular amplia debajo del umbo. Oldfield (1955) coincide con la descripción realizada por Forbes y Hanley (1853) con la salvedad de que estos últimos autores confunden los lados anterior y posterior de lo que se considera actualmente. Para el resto de las especies descritas dentro del género *Lasaea*, no hay descripciones en detalle de la charnela.

En los ejemplares analizados de la costa central del Golfo San Jorge mediante imágenes tomadas con microscopio electrónico de barrido, se distingue una charnela que coincide en su fórmula dentaria con la descrita para el orden Veneroidea por Camacho (2007) con tres dientes cardinales pequeños en la valva derecha más dos dientes laterales anteriores y dos posteriores; por su parte, la valva izquierda presenta también tres dientes cardinales que encastran en forma complementaria con la valva opuesta más un diente lateral de cada lado. Las observaciones hechas mediante microscopio estereoscópico en individuos de distintas localidades de la costa patagónica, indican una estructura semejante de la charnela en cada caso, encontrándose sólo

diferencias ligeras en la forma de los bordes anterior y posterior y la coloración general de la valva.

En otros trabajos sobre el género *Lasaea* se han reportado variantes en la forma y coloración de los individuos como consecuencia de cambios en el entorno tales como exposición al oleaje, tipo de sustrato, cantidad de sedimento, altura de marea, y flora y fauna asociada en la comunidad en la que se encuentren, incluso entre animales recolectados en una misma localidad (Morton *et al.* 1957; Seed y O'Connor 1980; Crisp y Standen 1988; Ó Foighil y Eernisse 1988). Algunos autores proponen, incluso, que la formación de la prodisoconcha II puede estar sujeta a variaciones ambientales pudiendo ser modificada -por ejemplo- según la exposición al oleaje de los juveniles recién asentados y no como resultado directo del crecimiento de la valva embrionaria (Ó Foighil 1986).

Las localidades patagónicas consideradas para la recolección de *Lasaea*, pueden presentar características particulares como exposición al oleaje que se pueden traducir en ligeras variaciones morfológicas como color, tamaño y forma de los animales adaptados a cada sitio; sin embargo, la dentición observada en las charnelas de ejemplares de distintas localidades, no presentan variaciones.

Consideraciones sobre la anatomía branquial

La incubación de larvas es considerada un comportamiento especializado dentro de los bivalvos y ocurre en la mayoría de las familias de eulamelibranquios (Oldfield 1963; Dias-Passos y Domaneschi 2009). Típicamente, las especies de la superfamilia Galeommatoidea son ovovíparas con algún grado de cuidado de sus crías en las branquias. En general tanto las hemibranquias internas como externas cumplen funciones en la incubación de larvas (Jespersen y Lützen 2006).

Entre algunos bivalvos veneroideos incubadores de las familias Sphaeriidae y Corbiculidae se han reportado variaciones significativas en los caracteres anatómicos asociados a la incubación, tales como diferencias en el desarrollo de estructuras de las hemibranquias y las conexiones entre láminas

(Graf y Ó Foighil 2000). Korniuschin (2002) menciona en su trabajo sobre Sphaeriidae como principal tendencia evolutiva, la reducción de la hemibranchia externa a una sola lámina de menor tamaño que las láminas de la hemibranchia interna. El autor considera estas modificaciones, adaptaciones a la incubación de sus crías en las branquias. Dias-Passos y Domaneschi (2009) proponen que la pérdida de laminillas en las hemibranchias es un carácter derivado; en consecuencia, aquellas especies donde falta la hemibranchia externa completa (por ejemplo, *Mysella narchii*) e incluso la laminilla ascendente de la hemibranchia interna (por ejemplo, *M. charcoti*), se encontrarían en un estado de mayor desarrollo que sus predecesores eulamelibranquios con dos hemibranchias en cada branchia.

Para el género *Lasaea*, Oldfield (1955) describe una hemibranchia externa reducida sólo con una lamela descendente corta, adherida al lóbulo del manto. La autora indica que en *Lasaea* los filamentos de las lamelas ascendentes son más cortos que en las lamelas descendentes y hay poca cantidad de filamentos branquiales (cerca de veinte) en cada caso, unidos entre sí por poca cantidad de uniones; encuentra en los animales observados, escasas uniones interlamelares en cada hemibranchia.

En ejemplares patagónicos de *Lasaea* se observaron algunas características similares a las propuestas por otros autores en especies incubadoras que estarían destinadas, principalmente, a la distensión de las branquias sin que éstas se desgarran durante el desarrollo de embriones en la cámara suprabranquial, tales como la reducción en la hemibranchia externa adosada al manto, abundantes uniones interfilamentares elásticas, fusiones entre láminas y con la masa visceral y la escasa cantidad de uniones entre láminas. Asimismo, la abundante cantidad de cilios frontales, la disposición ántero-posterior de los sifones y las branquias transversales a la circulación de agua, estarían destinados a una adecuada oxigenación de los embriones y juveniles próximos a ser liberados. Estas adaptaciones encontradas en ejemplares de *Lasaea* de la costa patagónica, coinciden con las observadas por otros autores para distintas especies de *Lasaea* que incuban sus larvas

hasta estadios avanzados (Oldfield, 1963; Ó Foighil 1988, 1989) y representa una estrategia exitosa en el mecanismo reproductivo.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

CICLO REPRODUCTIVO DE *LASAEA* EN LA COSTA CENTRAL DEL GOLFO SAN JORGE, ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

La reproducción en invertebrados marinos y en particular referida a moluscos, ha sido abordada en numerosos trabajos generales o de revisión (Thorson 1950; Giese 1959; Vance 1973; Christiansen y Fenchel 1979; Sastry 1979; Pearse *et al.* 1991; Clarke 1992; Eckman 1996; Pechenik 1999; Ramírez-Llodra 2002; Sponaugle *et al.* 2002, entre otros). En los bivalvos marinos bentónicos, típicamente se distinguen dos mecanismos principales de desarrollo; por un lado, aquellos con un ciclo de vida que incluye un período larval planctónico o bien, organismos que desarrollan sus larvas en el interior del adulto hasta liberarlas como juveniles. En algunos grupos como gasterópodos prosobranquios, los huevos desarrollan en cápsulas que quedan adheridas al sustrato durante el desarrollo (Christiansen y Fenchel 1979; Eckman 1996). Estas estrategias reproductivas en una especie cumplen un rol por demás importante en la dinámica de sus poblaciones y su distribución geográfica (Ramírez-Llodra 2002).

Típicamente, los bivalvos son gonocóricos y presentan sólo reproducción sexual (Sastry 1979; Heller 1993; Korniushev y Glaubrecht 2003; Gosling 2008; Leonard 2013). Estos autores coinciden al asumir que el hermafroditismo se da en unas pocas familias de los bivalvos (sólo en 9 %). El hermafroditismo simultáneo es un mecanismo empleado dentro de varios grupos animales y se ha sugerido que este modo de reproducción presenta un significado adaptativo ventajoso en aquellos organismos con movilidad reducida, sésiles o de escasa dispersión (Heath 1979; Strathmann *et al.* 1984).

La superfamilia Galeommatoidea representa el grupo de bivalvos con estrategias reproductivas más variadas y complejas (Ockelmann y Kirsten

1978; Ó Foighil 1985). Los galeomátidos pueden ser hermafroditas protándricos, protogínicos o simultáneos y, en la mayoría de los casos, presentan un desarrollo de sus larvas en la cámara suprabranquial (Ó Foighil 1989; Jespersen y Lützen 2006; Fox *et al.* 2007). Entre estos organismos hermafroditas, es posible encontrar algunos géneros (por ejemplo *Lasaea*, *Lissarca*, *Mysella*, *Musculium*, *Tellimya*) donde la gónada se desarrolla como un ovotestis (Popham 1940; Oldfield 1955; Beauchamp 1986; Ó Foighil 1987; Petersen y Lützen 2008; Jara-Seguel *et al.* 2011; Zelaya e Ituarte 2012). Algunos autores consideran que una escasa cantidad de gametos en general y en particular, poco esfuerzo destinado a la producción de espermatozoides, podría relacionarse con mecanismos reproductivos hermafroditas simultáneos (Strathmann *et al.* 1984; Beauchamp 1986).

En general, los bivalvos tienen un espermatozoide primitivo, de reducido tamaño, con una cabeza redondeada o cónica coronada por un acrosoma pequeño, de forma variable, con una pieza media corta con 4-5 mitocondrias y una cola de unos 50 μm de largo (Franzén 1983). Esta organización general de los espermatozoides en bivalvos es semejante a la observada en otros grupos de invertebrados, como en otros moluscos, cnidarios, poliquetos y equinodermos (Eckelbarger *et al.* 1990; Erkan y Sousa 2002). Popham (1974) compara las características morfológicas de los espermatozoides de algunas especies de bivalvos de la familia Teredinidae, algunas con fecundación externa y otras con fecundación en la cavidad del manto. De acuerdo a estas investigaciones, ambos grupos de bivalvos tienen un tipo de espermatozoide primitivo que se diferencia en la estructura fina; los espermatozoides que intervienen en una fertilización externa presentan colas más largas y acrosomas más grandes que aquellos donde la fecundación es interna. Dentro de los galeomátidos se han registrado algunas características inusuales en la morfología de sus espermatozoides, como son una asimetría de rotación causada por la ligera curvatura del núcleo y la posición subterminal del acrosoma y forma de la cabeza ligeramente curva. Estas particularidades, se encuentran relacionadas con los mecanismos de fertilización que presentan los organismos y el ambiente en el cual los gametos masculinos son liberados

(Eckelbarger *et al.* 1990). Según Popham (1979), la estructura de los espermatozoides puede indicar de alguna manera si la especie es incubadora o no; sin embargo, entre los antecedentes sobre ultraestructura de los espermatozoides en especies de galeomátidos incubadores, no se han reportado importantes variaciones morfológicas (Eckelbarger *et al.* 1990).

El desarrollo de *Lasaea* ha sido estudiado por varios autores. Todas las especies dentro del género fueron citadas como hermafroditas simultáneas con incubación de sus larvas en la cámara suprabranquial (Oldfield 1955; Crisp *et al.* 1983; Ó Foighil 1985, 1986, 1987, 1989; Beauchamp 1986; Mc Grath y Ó Foighil 1986; Iwasaki 1996; Altnöder y Haszprunar 2008), a excepción de *L. australis* que se asocia a un mecanismo reproductivo hermafrodita, principalmente con fertilización cruzada y desarrollo larval planctotrófico (Ó Foighil 1988, 1989).

La estructura gonadal de *L. subviridis* para la costa oeste de Canadá y California (Ó Foighil 1985, 1987; Beauchamp 1986) y *L. rubra* para la costa este de Francia (Altnöder y Haszprunar 2008) coincide con la descripción hecha por Oldfield (1955) para las costas británicas, como un ovotestis simple donde se desarrollan tanto ovocitos como espermatozoides, conectado por un par de gonoductos a la cámara suprabranquial. Ó Foighil (1985) y Mc Grath y Ó Foighil (1986) añaden a esta descripción, una reducida proporción de la gónada masculina con un escaso número de espermatozoides producidos en el lóbulo posterior (aproximadamente 5 % del total de la gónada madura).

Los antecedentes sobre el ciclo gonadal e incubación de embriones indican patrones diferentes para las distintas especies estudiadas. *Lasaea rubra* en las costas británicas (Oldfield 1955) así como *L. nipponica* y *L. undulata* en Japón (Iwasaki 1996), presentan un desarrollo de embriones estacional restringido a los meses estivales. Por su parte, las poblaciones de *L. subviridis* estudiadas en la costa pacífica de América del Norte (Beauchamp 1986) y *L. rubra hinemoa* de Nueva Zelanda (Booth 1979) mostraron un ciclo reproductivo continuo, con uno o dos períodos de desove máximos durante el verano. Este patrón irregular en el periodo reproductivo, indica que la reproducción es variable dentro del género *Lasaea*, pudiendo estar

sincronizada con parámetros ambientales locales de amplia influencia en la reproducción, como lo es la temperatura del mar (Beauchamp 1986).

El objetivo general de este capítulo es analizar el ciclo reproductivo de la especie en la costa central del Golfo San Jorge, a través de: (1) describir el desarrollo del ovotestis; (2) registrar la variación temporal en el tamaño gonadal durante un lapso de dos años de muestreo en dos localidades cercanas (Caleta Córdova Norte y Km 3); (3) examinar los distintos estadios gonadales; (4) estudiar las variaciones temporales en la cantidad de espermatozoides presentes en la gónada masculina; (5) explorar la sincronía entre el desarrollo del tejido ovárico y el tejido testicular y (6) analizar la relación entre el ciclo reproductivo y la temperatura del agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

Las muestras para el análisis del ciclo reproductivo de *Lasaea* en la costa patagónica, se recolectaron en las playas de Caleta Córdova Norte (CCN) y Km 3, ambas localidades cercanas a la ciudad de Comodoro Rivadavia, en el centro del Golfo San Jorge.

Se tomaron muestras mensuales de entre 7 y 15 individuos adultos de *Lasaea* en la playa de CCN desde septiembre de 2005 a agosto de 2007 (24 meses) para su análisis histológico. En forma complementaria y con el fin de explorar cambios en los tamaños gonadales a lo largo del tiempo, se recolectaron en forma mensual 20 individuos aproximadamente con tallas superiores a 1 mm, desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 (25 meses) en cada una de las localidades antes mencionadas (CCN: n = 503, Km 3: n = 491). En las dos localidades, las muestras fueron recolectadas en el horizonte mesolitoral medio, considerando en cada toma de muestras el mismo nivel (2,40 m) calculado a partir de los datos de marea para el puerto de Comodoro Rivadavia provistos por el Servicio de Hidrografía Naval. Los ejemplares de *Lasaea* se recolectados entre el mejillinar (Fig.1), en sitios de escasa

pendiente. Los individuos fueron mantenidos en acuario con agua de mar recolectada para tal fin en una zona aledaña a la ciudad de Comodoro Rivadavia hasta su procesamiento en el laboratorio; la temperatura en acuario se mantuvo controlada simulando la temperatura superficial del agua correspondiente al periodo en que se tomaron las muestras; los ejemplares fueron alimentados con cultivo de *Tetraselmis* sp. provisto por el cepario de microalgas de la UNPSJB.

La información sobre temperatura superficial del agua de mar fue extraída a partir de la media de lecturas de las imágenes satelitales disponibles del Satélite MODIS-Aqua, para una región frente a la zona de estudio de ~650 km² (límites N: -45,83°; E: -67,42°; S: -46,13°; O: -67,13; constituida por ~9 píxeles dependiendo de la nubosidad) durante un período de ocho días. Los datos fueron generados por el sistema de datos *on line* Giovanni, desarrollado y mantenido por la NASA GES DISC (Acker y Leptoukh 2007).

Procedimientos de laboratorio

1. Observación de gónada en ejemplares patagónicos de *Lasaea*

En el laboratorio, se analizaron las muestras recolectadas mensualmente y mantenidas en agua de mar (ver apartado sobre procedimientos de muestreo explicado más arriba); los individuos fueron medidos (talla, mm) mediante microscopio estereoscópico (Zeiss STEMI DV4) con ocular graduado ($\pm 0,01$ mm) y se diseccionaron con el propósito de fotografiar en cada caso la gónada en el material fresco; para ello se utilizó una cámara digital de 9,2 megapíxeles conectada al microscopio; a partir de las imágenes tomadas, se registró el área total ocupada por el ovotestis (mm²).

2. Cortes histológicos

Los animales se fijaron en solución de Bouin, se deshidrataron en una serie de etanol en distinta graduación y se incluyeron en parafina. Los cortes se realizaron en micrótopo de deslizamiento manual con espesor de 5-6 μ m y las tinciones se efectuaron con tricrómico de Masson (Gabe 1968). Los preparados

se fotografiaron a 100 aumentos con una cámara digital OLYMPUS U-TVO 5X-C3 conectada a un microscopio OLYMPUS BX-51.

A partir de los cortes histológicos, se realizó la descripción citológica de la gónada en los distintos estadios de las células reproductivas femeninas y masculinas. Mediante la observación citológica, se consideraron tres estadios de la fracción gonadal femenina, caracterizados por el desarrollo de células gaméticas presentes y grado de vitelogénesis general y de las propiedades de tinción en cada caso; se registraron los diámetros y áreas de los ovocitos (n=6.389 ovocitos en total) en los distintos estados de desarrollo; las mediciones se efectuaron sobre todos los ovocitos con nucléolo visible y en ovocitos con vitelogénesis avanzada donde no es posible distinguir el nucléolo, se consideraron para la medición células que presentaran un contorno definido respecto del total de ovocitos contenido en el tejido ovárico. Para el tejido masculino, se estimó la proporción ocupada por espermatozoides respecto del área testicular total; los datos fueron categorizados en cuatro rangos (< 25%, 25-50%, 50-75%, >75%). Los criterios utilizados, se tomaron de Beauchamp (1986) para *L. subviridis*.

3. Observación de espermatozoides

A efectos de una mejor descripción de las células reproductivas, se realizó un extendido del tejido gonadal fresco en portaobjetos excavados de manera de poder observar al microscopio la morfología y movilidad de los espermatozoides; se registraron los diámetros de la cabeza y longitud del flagelo de los espermatozoides (n=82) a partir de las fotografías tomadas en microscopio óptico a 1.000 aumentos.

4. Análisis de fotografías

En todos los casos, las mediciones de fotografías se realizaron con el programa para análisis de imágenes de uso libre ImageJ 1.42q (Abràmoff *et al.* 2004).

5. Análisis de los datos

Se examinaron las variaciones temporales en el área gonadal media durante los dos años de muestreo, para cada una de las localidades (CCN y Km 3) mediante un análisis de covarianza factorial (ANCOVA). En el mismo se consideró al mes y la localidad como factores fijos, y la talla como covariable. Para realizar este análisis, se verificaron previamente los supuestos de homogeneidad de pendientes entre los niveles de los efectos principales y de la interacción y los supuestos de homocedasticidad y normalidad, utilizando la prueba de C de Cochran y Shapiro-Wilks respectivamente (Quinn y Keough 2002). El modelo de ANCOVA utilizado para el estudio de la reproducción ha sido recomendado y utilizado por diferentes autores, debido a que cuenta con ventajas considerables frente al uso de índices corporales (Packard y Boardman 1999; Ebert *et al.* 2011).

Se verificaron cambios en las proporciones de los estadios gonadales tanto para el tejido ovárico como la fracción testicular mediante pruebas de χ^2 de Pearson para datos no ordenados (Lynch *et al.* 1991).

La variación mensual en los diámetros y áreas de ovocitos fueron analizados a través de análisis exploratorios utilizando histogramas de frecuencias relativas y gráficos de cajas (*box-plot*) para ambas variables en cada mes y localidad (Grant y Tyler 1983; Quinn y Keough 2002).

A fin de evaluar el desarrollo del tejido testicular a partir de los cortes histológicos, se analizó la variación temporal en la cantidad relativa de espermatozoides mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Con el propósito de examinar la relación entre el desarrollo del tejido testicular y del tejido ovárico y evaluar la sincronía en la emisión de gametos, se analizó la relación entre la cantidad relativa de espermatozoides (ordinal, 4 niveles) y el estadio gonadal femenino (ordinal, 3 niveles) mediante una prueba exacta de χ^2 de Pearson con permutaciones de Monte Carlo (Lynch *et al.* 1991). Se realizaron pruebas de contingencia exactas dado que se encontraron valores esperados menores a cinco (Agresti 2007).

Finalmente, con el objeto de examinar la asociación del ciclo reproductivo con la temperatura superficial del agua de mar, se llevó a cabo

una correlación no paramétrica de Spearman (R) entre esta variable ambiental y el área gonadal total, diámetro de ovocitos y cantidad de espermatozoides como variables respuesta (Siegel y Castellan 1988).

Las pruebas estadísticas de ANCOVA, Kruskal-Wallis y Spearman fueron realizadas utilizando el paquete estadístico STATISTICA 7.0 (Statsoft), en tanto que las pruebas de χ^2 de Pearson (asintóticas y exactas) para tablas de contingencia no ordenadas se realizaron mediante el programa estadístico StatXact 9.0 (Cytel Studio). En todos los casos se utilizó un nivel de significación de 5 %.

RESULTADOS

Descripción del ovotestis

Los ejemplares patagónicos de *Lasaea* son hermafroditas, con desarrollo de los ovocitos y espermatozoides dentro de un mismo ovotestis. La gónada presenta una coloración blanca opaca durante todo su desarrollo, formada por dos lóbulos dorsales unidos entre sí en la parte anterior y se encuentra envolviendo a la glándula digestiva (Fig. 12). En el análisis macroscópico, no se diferencian las regiones del tejido ovárico y tejido testicular (Fig. 12). Sin embargo, a partir de cortes histológicos se puede distinguir una zona anterior donde desarrollan los ovocitos y una zona posterior, más pequeña, donde se producen los espermatozoides. El saco gonadal en su conjunto se encuentra rodeado por una pared folicular.

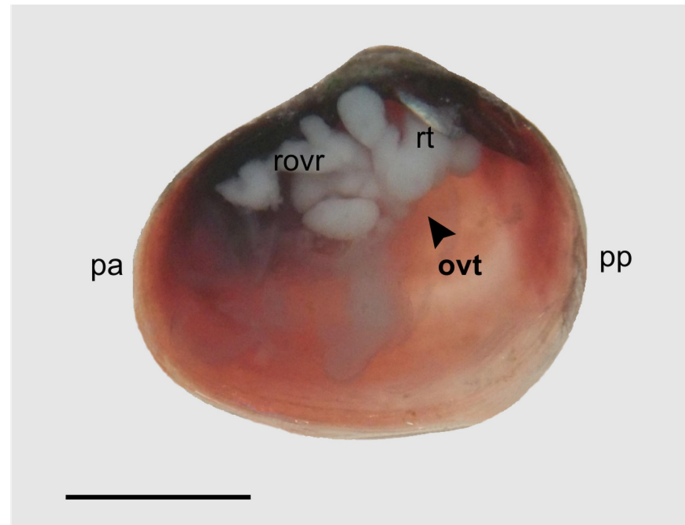


Figura 12. Aspecto de la gónada dentro de la valva. ovt: ovotestis; rovr: región ovárica; rt: región testicular; pa: parte anterior de la valva; pp: parte posterior. Escala 1 mm.

Desarrollo del tejido ovárico

El análisis e interpretación de los cortes histológicos realizados han permitido diferenciar tres estadios gonadales respecto al tejido ovárico (Fig. 13):

Estadio gonadal inicial (Ei): tejido ovárico sin indicios de procesos vitelogénicos, con prevalencia de ovogonias y ovocitos previtelogénicos con un diámetro mínimo de 2,18 μm y un máximo de 49,90 μm (\bar{x} =29,03 \pm DE 14,45 μm ; n=797 ovocitos). Las células son esféricas, presentan un núcleo cromóforo central o ligeramente excéntrico, con uno o dos nucleolos grandes, basófilos, fuertemente teñidos y ubicados por lo general sobre las paredes del núcleo. Estas células se encuentran dispuestas sobre la periferia del saco gonadal (Fig. 13a).

Estadio gonadal con previtelogénesis (Evi): tejido ovárico con dominancia de ovocitos de mayor tamaño con un diámetro que varía entre 50 μm y 150 μm (\bar{x} =65 \pm 31,70 μm ; n=3.387 ovocitos); las células presentan forma esférica pero, a diferencia del estadio anterior, se observa una vitelogénesis inicial, donde los ovocitos presentan un citoplasma más acidófilo; aún se distinguen el núcleo y uno o dos nucleolos. Las células ocupan todo el

saco gonadal y se puede apreciar células foliculares que aportarán principalmente nutrientes al vitelo de los ovocitos (Fig. 13b).

Estadio gonadal con vitelogénesis avanzada (Eva): en general, a partir de los cortes histológicos se observan escasos ovocitos ($\bar{x} = 10 \pm 3$ ovocitos por individuo; 45 individuos considerados) y de gran tamaño, con un diámetro que oscila entre 151 μm y 796 μm ($\bar{x} = 202 \pm 72,99$ μm ; $n=2.205$ ovocitos). Las células pueden presentar forma irregular y por lo general se encuentran amontonadas dentro del saco gonadal; se caracterizan por presentar una vitelogénesis avanzada con gran cantidad de gránulos de vitelo y, en general, no se distingue el núcleo que presenta una posición central. En casos aislados se pudo observar, junto con las células en estadios de vitelogenesis avanzadas, algunos ovocitos previtelogénicos, todos dispuestos en la misma gónada (Fig. 13c). Resulta particularmente interesante la observación de ovocitos con vitelogénesis avanzada exhibiendo estructuras del huso acromático características de una célula en división (Fig. 14).

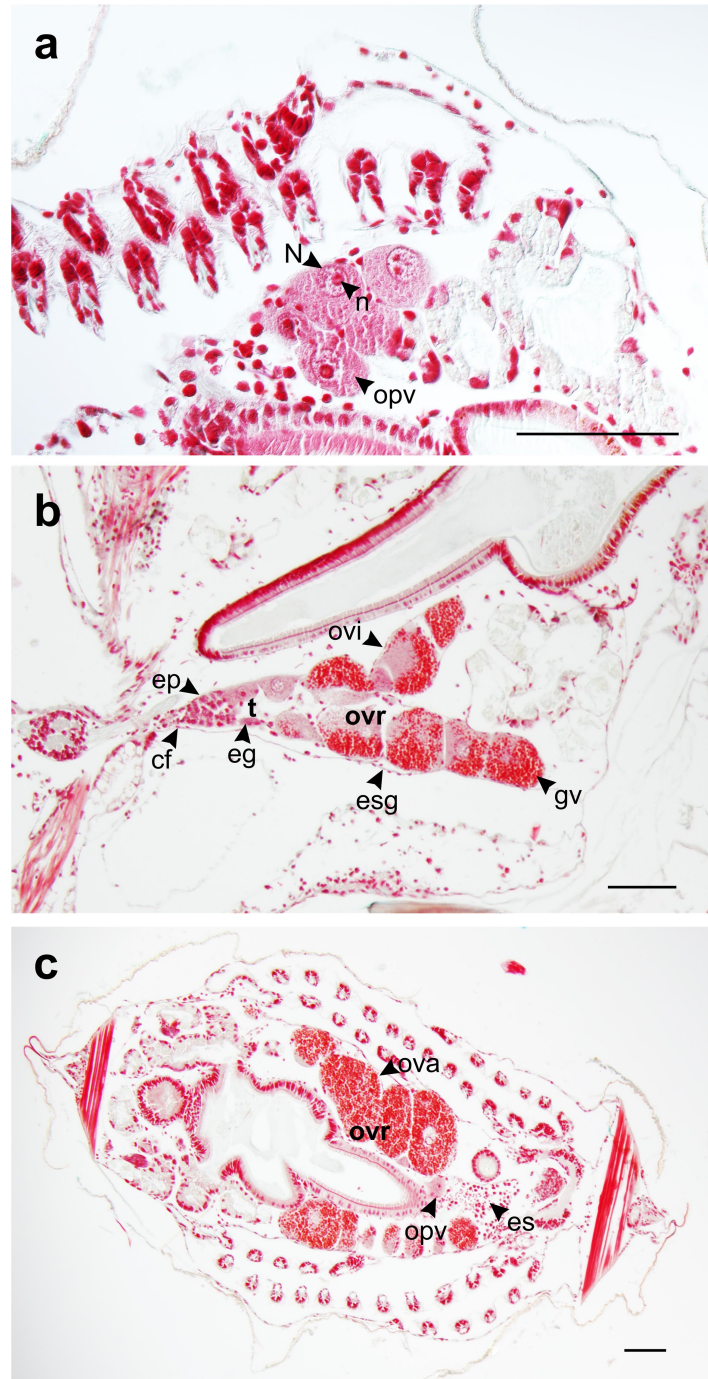


Figura 13. Distintos estadios de la ovogénesis. a) tejido ovárico inicial (Ei); b) tejido ovárico con vitelogénesis inicial (Evi); c) tejido ovárico con vitelogénesis avanzada (Eva). cf: células foliculares; eg: espermatogonia; ep: espermatocito; es: espermatozoide; esg: epitelio del saco gonadal; gv: gránulo de vitelo; N: núcleo; n: nucleolo; opv: ovocito previtelogénico; ova: ovocito en vitelogénesis avanzada; ovi: ovocito en vitelogénesis inicial; ovr: tejido ovárico; t: tejido testicular. Escalas 100 μ m.

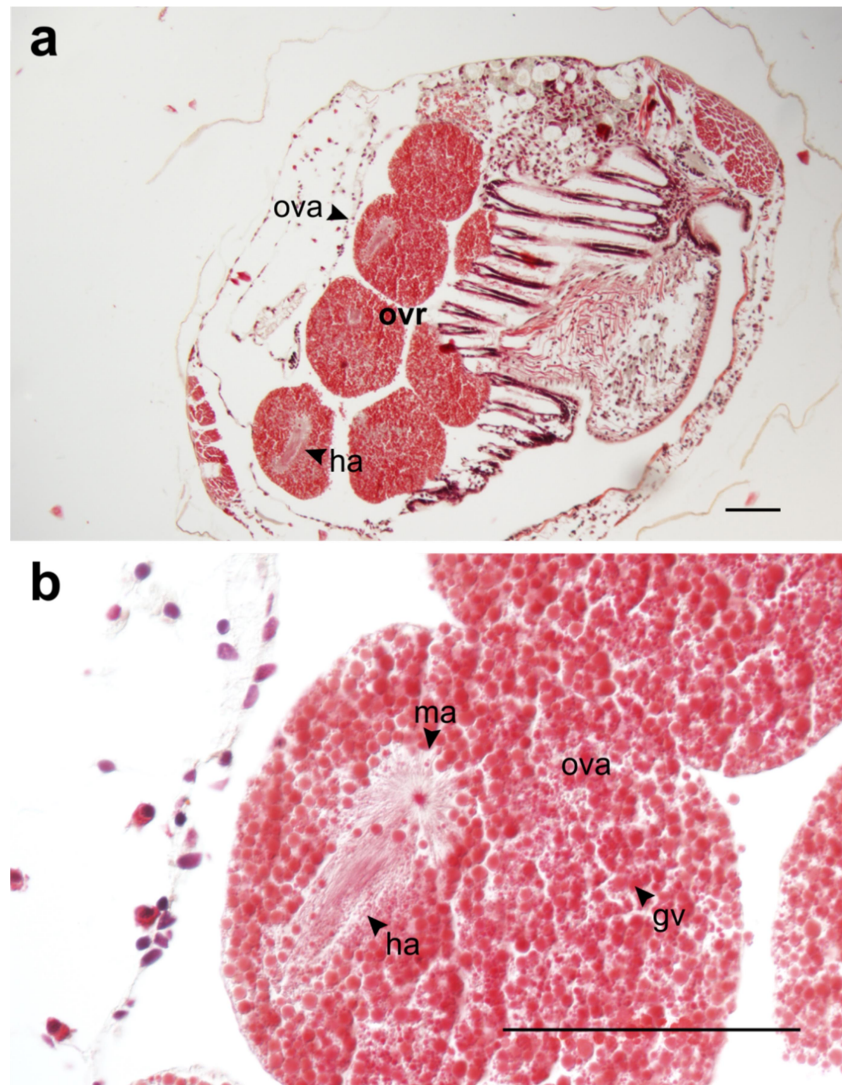


Figura 14. Ovocitos con vitelogénesis avanzada en división celular. a) vista general del tejido ovárico con ovocitos en división; b) vista en detalle del huso acromático característico de una división. ha: huso acromático; gv: gránulos de vitelo; ma: microtúbulos del áster; ova: ovocito en vitelogénesis avanzada; ovr: tejido ovárico. Escalas 100 μm .

Desarrollo del tejido testicular

El tejido testicular se diferencia claramente en el estadio de gónada con tejido ovárico inicial y, en menor medida, en los estadios de gónada con tejido ovárico con vitelogénesis inicial y vitelogénesis avanzada. La gónada masculina se ubica en la parte posterior del ovotestis con un área mínima de

0,0002 y una máxima de 0,04 mm², lo que representa en promedio 31 % del total de la gónada inmadura y en desarrollo.

Las distintas etapas de la espermatogénesis se pueden observar en los cortes histológicos. En el estadio de desarrollo, se encuentran las espermatogonias grandes y alargadas, donde el núcleo es central o ligeramente desplazado y se pueden apreciar la membrana nuclear y cromatina bien teñidas, con el citoplasma visible; estas células se disponen en forma ordenada sobre la pared del saco gonadal y presentan un diámetro que varía entre 22,03 μm y 45,06 μm (\bar{x} = 32,66 \pm 6,25 μm ; n=17) (Fig. 15a). Sobre el extremo posterior interno del tejido testicular se encuentran los espermatocitos primarios, de aspecto más redondo que las espermatogonias, con un núcleo grande ocupando casi la totalidad de la célula y con diámetros entre 9,88 μm y 23,85 μm (\bar{x} = 17,16 \pm 3,20 μm ; n=26); aquí el citoplasma es apenas diferenciable (Fig. 15a). Hacia el lumen, se diferencian los espermatocitos secundarios como células esféricas más pequeñas que las anteriores, con diámetros de entre 5,98 μm y 13,58 μm (\bar{x} = 10,05 \pm 2 μm ; n=24) y con el núcleo ocupando casi la totalidad de la célula. Finalmente, en el centro del lumen y en forma desordenada se observan las espermátidas, con un diámetro que varía entre 4,5 μm y 9,5 μm (\bar{x} = 7,04 \pm 1,22 μm ; n=40), de aspecto redondeado con el núcleo claramente basófilo y sin citoplasma visible; se pueden observar mezcladas con los espermatozoides, pero se diferencian de éstos por su tamaño (Fig. 16a). Los espermatozoides se observan en algunos casos dispersos entre los espacios intersticiales de los ovocitos maduros (Fig. 15b).

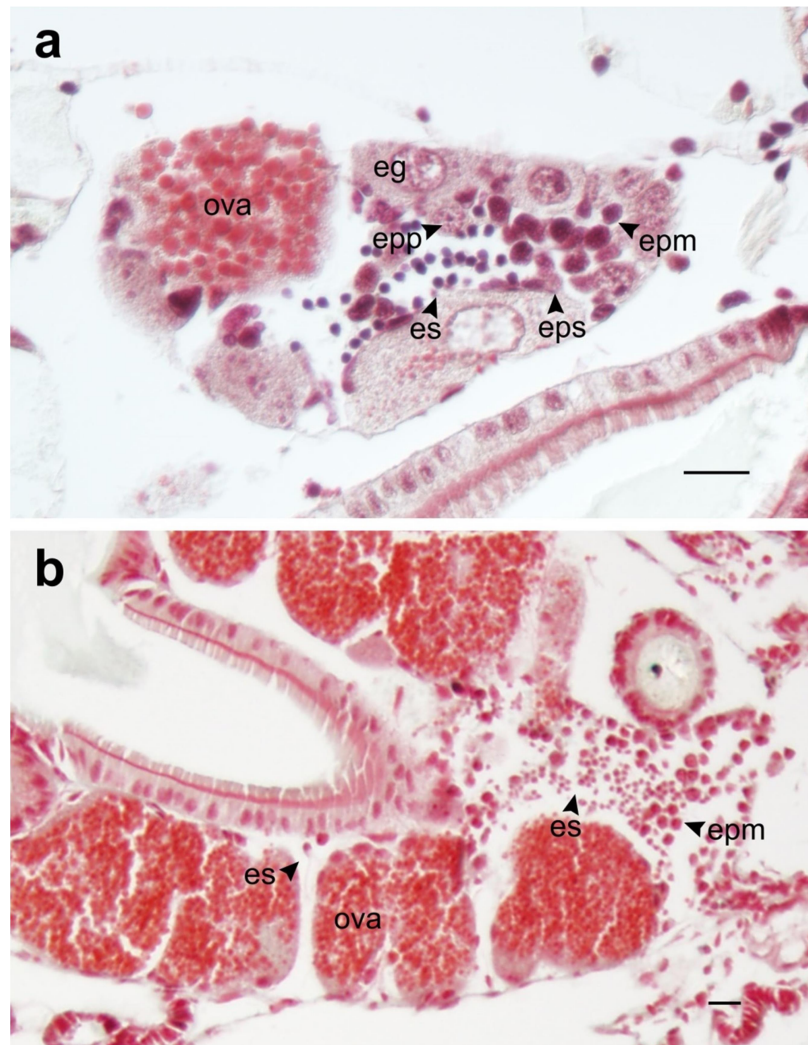


Figura 15. Tejido testicular en la gónada de *Lasaea*. a) distintos estadios de la espermatogénesis; b) vista general de una gónada madura con espermatozoides intersticiales entre los ovocitos. eg: espermatogonia; epm: espermátida; epp: espermátocito primario; eps: espermátocito secundario; es: espermatozoide; ova: ovocito en vitelogénesis avanzada. Escalas 20 μm .

Al observar el tejido gonadal fresco al microscopio (Fig. 16), se pudo apreciar la morfología de los gametos masculinos en detalle (Fig. 16a). Los espermatozoides son móviles, de cabeza esférica (diámetro: $\bar{x} = 5,41 \mu\text{m} \pm 0,44 \mu\text{m}$, rango = 5 – 5,50 μm ; área $\bar{x} = 20,63 \mu\text{m}^2 \pm 3,16 \mu\text{m}^2$; n=82) y un acrosoma bien diferenciado (Fig. 16b). En el extendido de tejido gonadal fue posible distinguir los espermatozoides con dos flagelos de distinta longitud

(flagelo largo: $\bar{x} = 36,98 \mu\text{m} \pm 5,02 \mu\text{m}$; flagelo corto: $\bar{x} = 11,43 \mu\text{m} \pm 4,27 \mu\text{m}$; $n=30$) (Fig. 16c).

Cuando la gónada se encuentra en un estadio de vitelogénesis inicial (Fig. 17) con recuperación de las células germinales femeninas, es posible diferenciar en la parte masculina dos estados diferentes. En ocasiones se aprecia una gónada masculina con proliferación de células, con el lumen del tejido testicular total o parcialmente ocupado por células en las distintas etapas de espermatogénesis (Fig. 17a). En cambio, en otros casos, fue posible distinguir una gónada donde en la porción masculina sólo se observan espermatogonias dispuestas en forma ordenada sobre la pared, con el lumen del tejido testicular vacío o escasos espermatozoides, indicando claramente una gónada en estado de evacuación total (Fig. 17b).

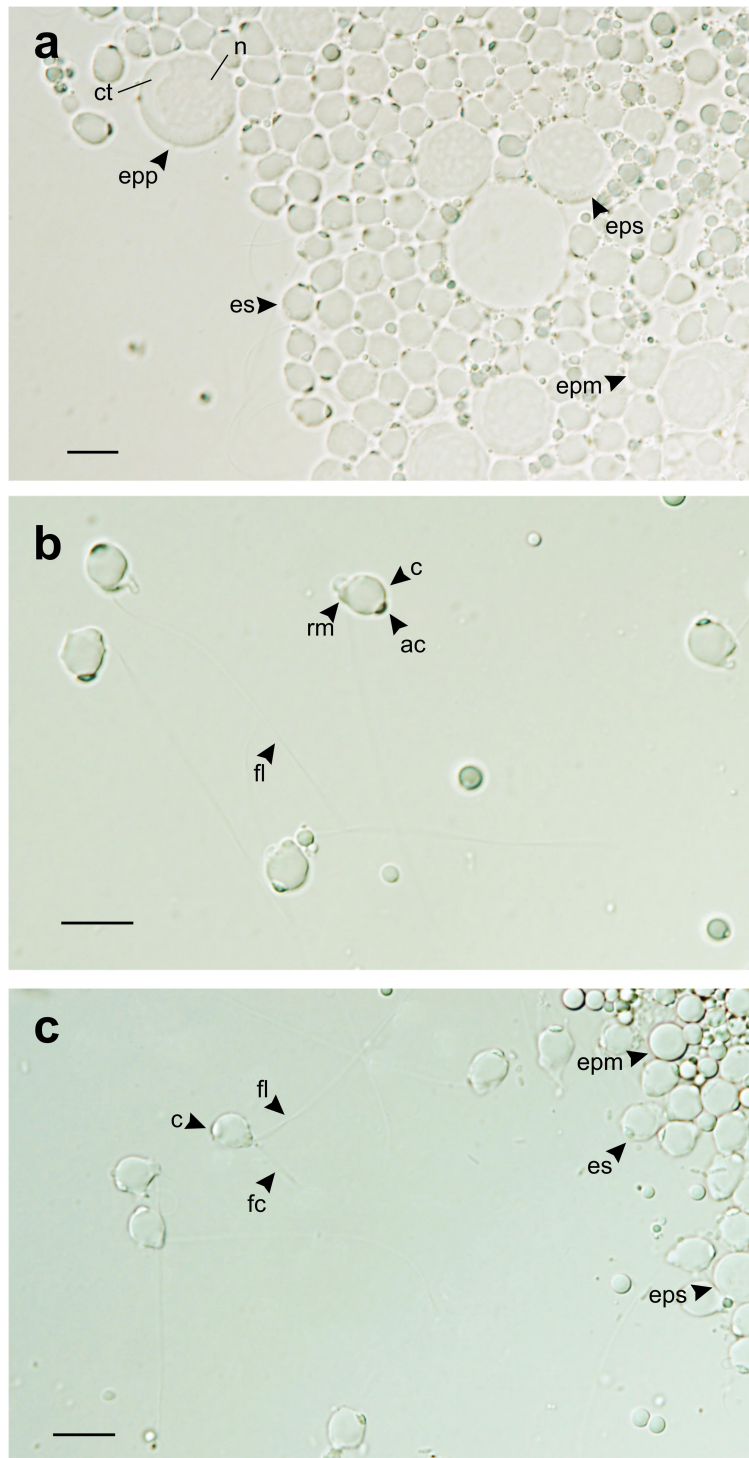


Figura 16. Extendido de tejido gonadal fresco. a) distintos estadios de las células germinales masculinas; b) espermatozoides; c) vista del flagelo largo y flagelo corto. ac: acrosoma; c: cabeza; ct: citoplasma; epm: espermátida; epp: espermatocito primario; eps: espermatocito secundario; es: espermatozoide; f: flagelo; fc: flagelo corto; fl: flagelo largo; n: núcleo; rm: región media. Escalas 10 μm.

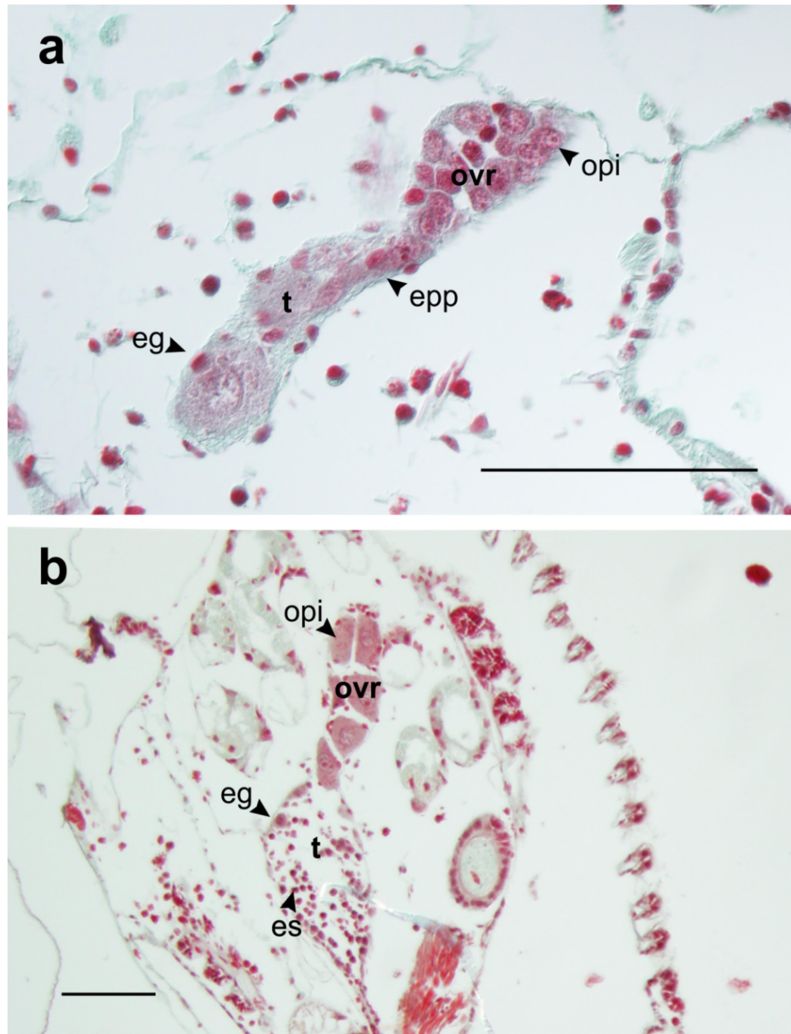


Figura 17. a) estadio gonadal inicial en recuperación con espermatogonias y espermatocitos primarios; b) gónada parcialmente evacuada con ovocitos previtelogénicos inmaduros, aparición de espermatogonias y espermatozoides remanentes. eg: espermatogonia; epp: espermatocito primario; es: espermatozoide; opi: ovocito previtelogénico inmaduro; ovr: tejido ovárico; t: tejido testicular. Escala 100 μm.

Análisis del ciclo gonadal

Variación temporal del área gonadal total

El análisis de la variación mensual del tamaño gonadal expresado mediante el área total del ovotestis y ajustado según la talla, muestra diferencias entre las dos localidades consideradas (CCN y Km 3). Un ANCOVA factorial, mostró una interacción altamente significativa entre los sitios y los distintos meses de muestreo, indicando un ciclo asincrónico entre localidades (Tabla 1). Durante el primer año de muestreo (2010), las medias ajustadas de área gonadal resultaron mayores en CCN comparados con los de Km 3, en tanto que durante el segundo año de muestreo (2011) no se observan diferencias notorias entre sitios y presentaron un patrón de variación mensual irregular. En ambas localidades se puede observar un descenso en las áreas gonadales en los meses de verano (enero-febrero), con valores similares para las dos localidades en el año 2011; durante los meses de otoño e invierno se observa un incremento en ambas localidades. Estos resultados podrían corresponderse con los períodos de recuperación de la gónada. Sólo para la localidad de CCN se observa una pequeña disminución en el tamaño gonadal total durante el período invernal (junio) para el segundo año de muestreo (Fig. 18).

Tabla 1. ANCOVA factorial. Efectos del mes y localidad sobre el área gonadal; el efecto de la talla fue incluido en el modelo como covariable.

Variables	SC	gl	CM	F	p
Talla	18,96	1	18,96	325,49	<0,001
Localidad	1,60	1	1,60	27,53	<0,001
Mes	8,77	24	0,37	6,27	<0,001
Localidad x Mes	4,32	24	0,18	3,09	<0,001
Error	54,77	940	0,06		

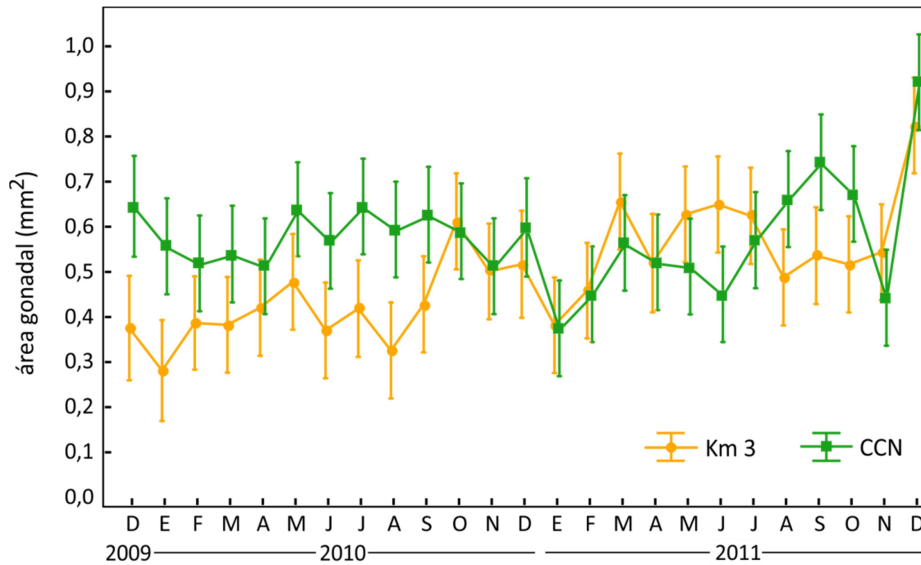


Figura 18. Variación mensual de las áreas gonadales totales medias para las dos localidades consideradas entre diciembre de 2009 y diciembre de 2011. Las medias fueron ajustadas a una talla media del animal de 2,22 mm. Las barras de error indican un intervalo de confianza de 95 %.

Variación temporal de los estadios gonadales femeninos

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de χ^2 de Pearson, las proporciones de los diferentes estadios gonadales del tejido ovárico (Ei: tejido ovárico previtelogénico; Evi: tejido ovárico con vitelogénesis inicial; Eva: tejido ovárico con vitelogénesis avanzada) identificadas en los cortes histológicos, varían significativamente en forma mensual ($p < 0,001$). Estos resultados indican un desarrollo del tejido ovárico (Evi) durante todo el año para los dos años de muestreo a excepción del periodo comprendido entre octubre y noviembre de 2005, donde no se registra gónada femenina en desarrollo. El estadio de madurez total del tejido ovárico, presenta disminuciones en las frecuencias en los meses de verano (enero-febrero) en los dos años de muestreo y en los meses de invierno (junio-julio) en el primer año, y en otoño (abril) para el segundo. Esta disminución en las frecuencias de tejido ovárico maduro está seguida en todos los casos de un incremento del estadio gonadal sin vitelogénesis que incluye la gónada recién evacuada y en recuperación (Fig. 19), indicando así dos periodos de desove por año.

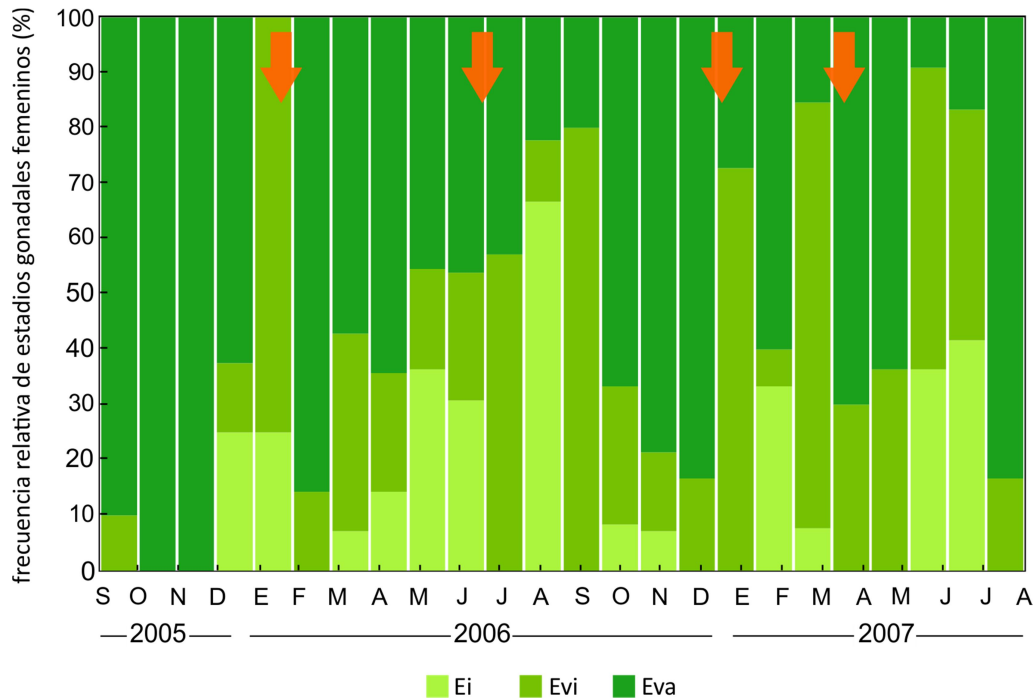


Figura 19. Variación en las frecuencias de los distintos estadios gonadales femeninos entre septiembre de 2005 y agosto de 2007 considerados a partir de cortes histológicos. Ei: tejido ovárico previtelogénico; Evi: tejido ovárico con vitelogénesis inicial; Eva: tejido ovárico con vitelogénesis avanzada. Las flechas indican emisiones del tejido ovárico a la cámara suprabranquial.

Variación temporal de los diámetros y áreas ovocitarias

Las variaciones mensuales en las distribuciones de frecuencia de los diámetros y áreas ovocitarias, correspondientes a los tres tipos de ovocitos identificados en los cortes histológicos (previtelogénicos, vitelogénicos iniciales y vitelogénicos avanzados) presentan un patrón de distribución semejante (Figs. 20 y 21).

En general, se observan distribuciones bimodales; los máximos corresponden a ovocitos con vitelogénesis inicial, a excepción de los dos primeros meses, septiembre y octubre de 2005, donde los máximos se dan en ovocitos vitelogénicos avanzados.

Los ovocitos vitelogénicos iniciales (50-150 μm de diámetro y áreas entre 0,01-0,001 mm^2) muestran un desarrollo importante durante todo el año, dando idea de una etapa de proliferación extendida en el tiempo. Los ovocitos

vitelogénicos avanzados de mayor tamaño, muestran también mayor variabilidad temporal en los diámetros y áreas medidas (ovocitos superiores a $150\ \mu\text{m}$ de diámetro y áreas entre $0,01\text{-}0,019\ \text{mm}^2$). Los ovocitos de mayor tamaño (superiores a $480\ \mu\text{m}$ de diámetro y $0,04\ \text{mm}^2$ de área) dominan durante los meses de primavera y se observa una disminución de los mismos a principio de verano; esto podría corresponder con un desove estival hacia la cámara suprabranquial. Este patrón se repite durante los dos años de estudio. En los meses de otoño – invierno comienza la acumulación de ovocitos vitelogénicos en crecimiento (tallas más pequeñas de células con vitelo) preparándose para un nuevo desove (Figs. 20 y 21). Las células de menor tamaño (diámetros menores a $50\ \mu\text{m}$ y que no superan los $0,0009\ \text{mm}^2$) corresponden a ovocitos inmaduros sin vitelo; los valores más altos de estas células se pueden observar en los meses posteriores al desove (Figs. 20 y 21).

En la figura 22 se ilustra la variación mensual de los valores de la mediana del tamaño de los ovocitos (diámetro y área), sin discriminar en categorías de desarrollo. En los meses de primavera – inicio de verano se observa la mayor variabilidad, correspondiente con las tallas de ovocitos vitelogénicos avanzados. En los meses de verano (enero-febrero) se pueden apreciar los menores valores en los tamaños de los ovocitos coincidiendo con el período de desove. Ya en los meses de julio – agosto de 2006 se observa una pequeña disminución, lo que podría corresponderse con un nuevo desove.

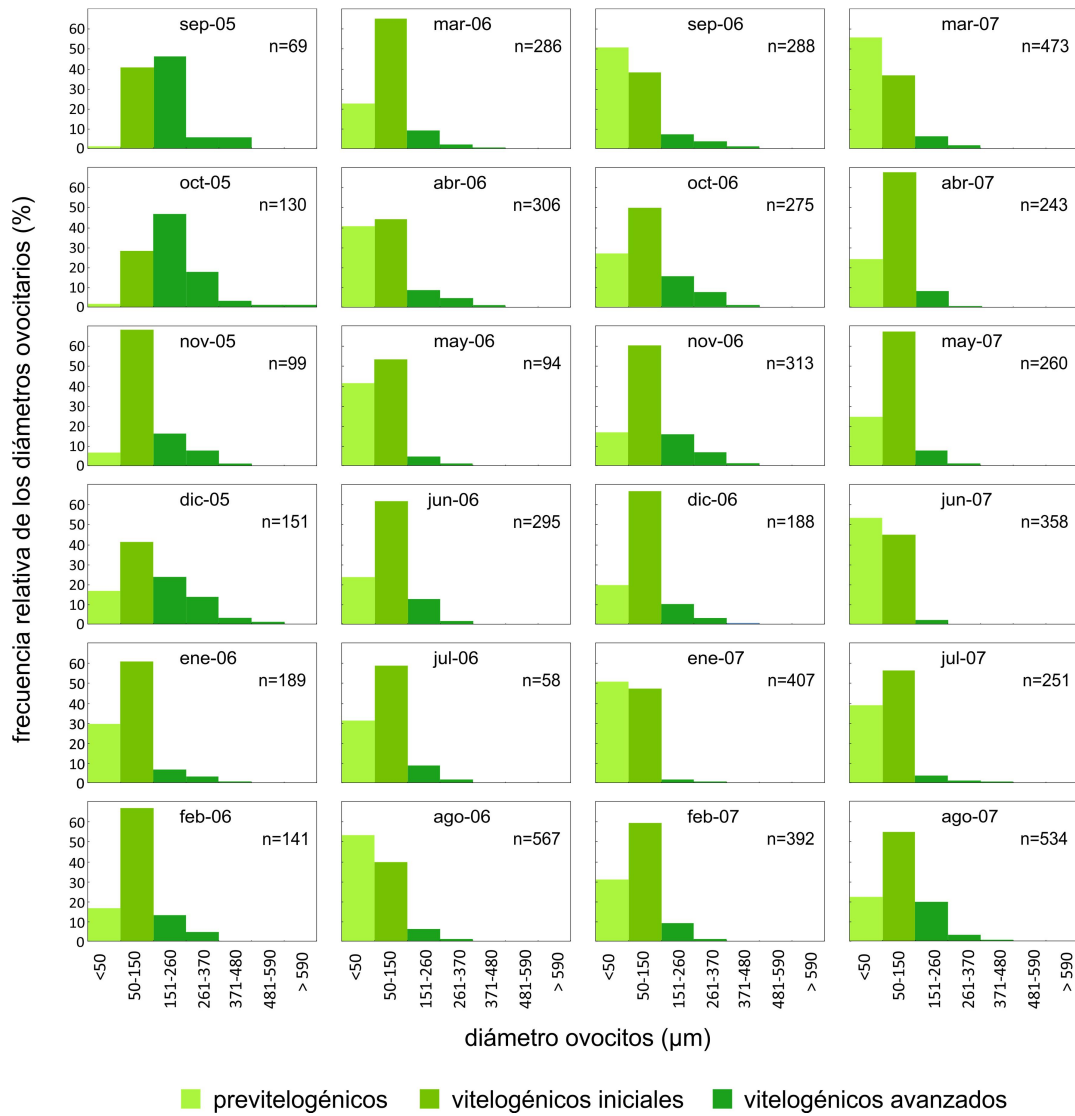


Figura 20. Distribución de frecuencias de los diámetros ovocitarios para el período septiembre 2005 a agosto 2007. Se indican los distintos tipos de ovocitos observados (previtelogénicos, vitelogénicos iniciales, vitelogénicos avanzados). n=cantidad de ovocitos medidos sobre el total de individuos (15-20 adultos) analizados en cada mes.

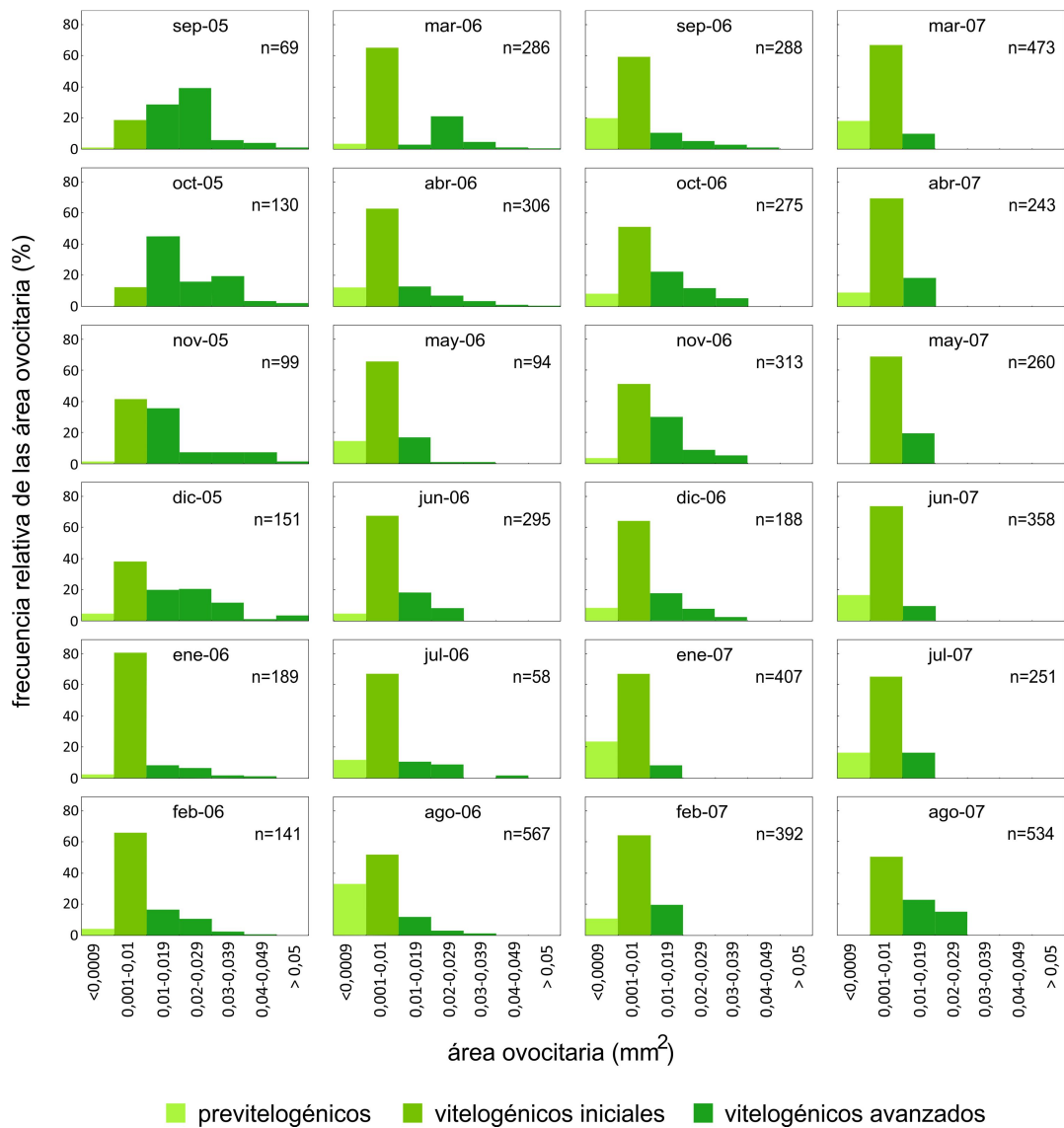


Figura 21. Distribución de frecuencias de las áreas ovocitarias para el período septiembre 2005 a agosto 2007. Se indican los distintos tipos de ovocitos observados (previtelogénicos, vitelogénicos iniciales, vitelogénicos avanzados). n=cantidad de ovocitos medidos sobre el total de individuos (15-20 adultos) analizados en cada mes.

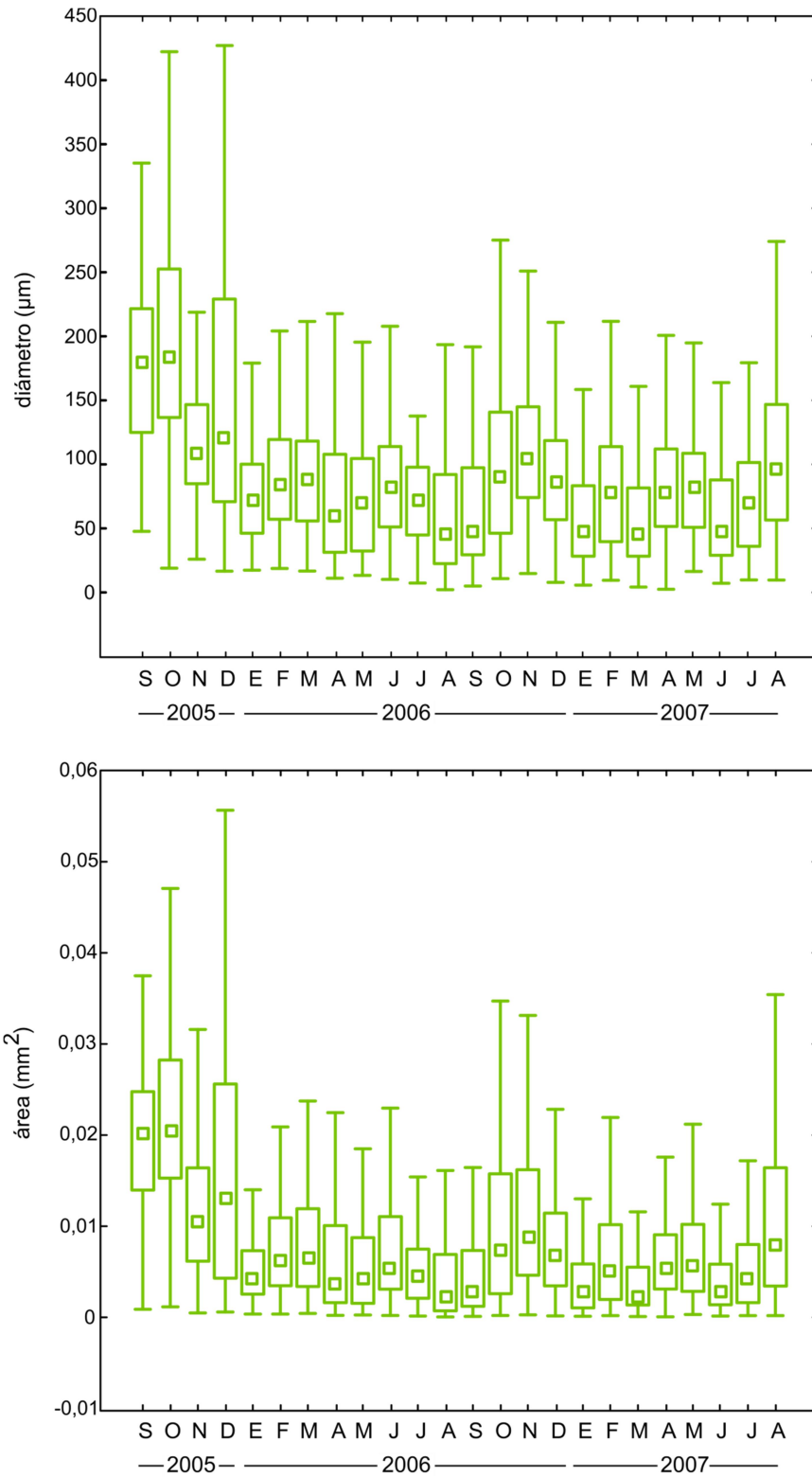


Figura 22. Variación mensual de los valores de mediana, primer y tercer cuartil y valores máximos y mínimos de los diámetros y áreas de ovocitos.

Variación temporal en la cantidad relativa de espermatozoides

El análisis no paramétrico llevado a cabo para analizar la variación temporal en la cantidad relativa de espermatozoides en el tejido testicular muestra diferencias significativas ($H=107,6$; $p<0,001$) en el periodo considerado (septiembre 2005 a agosto 2007). En la figura 23 se grafican las variaciones mensuales para la cantidad relativa de espermatozoides dentro del tejido testicular. Durante el periodo considerado, a excepción de algunos meses (septiembre de 2005, diciembre 2005, abril y junio 2006, mayo y julio de 2007), la mayoría de los individuos analizados presenta más de 25 % de la gónada masculina ocupada por espermatozoides. En general, para los dos años de estudio se puede observar que la cantidad de individuos con más de 75 % de espermatozoides ocupando el tejido testicular disminuye durante los meses de verano (diciembre de 2005 y febrero de 2006) e invierno (junio de 2006 y julio de 2007).

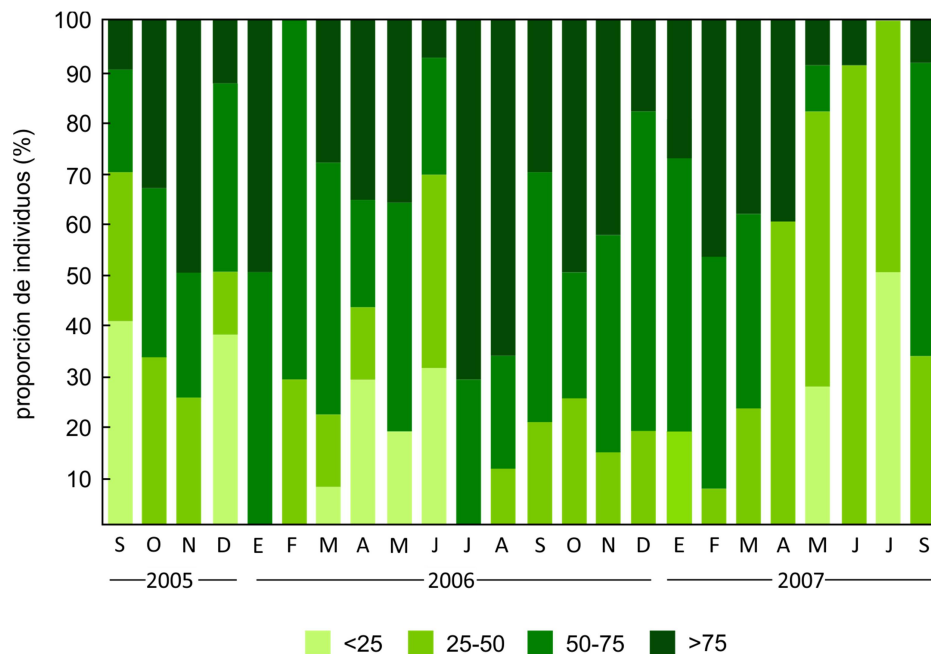


Figura 23. Variación mensual en la proporción de individuos según porcentaje relativo de espermatozoides para el período septiembre 2005 a agosto 2007.

Sincronía entre el desarrollo testicular y ovárico

Las comparaciones llevadas a cabo mediante una prueba exacta de χ^2 de Pearson con permutaciones de Monte Carlo para evaluar la maduración del tejido testicular respecto de la fracción gonadal femenina, mostraron resultados altamente significativos ($p < 0,0001$), indicando que el porcentaje relativo de espermatozoides depende del grado de desarrollo del tejido ovárico.

La mayor proporción de espermatozoides (entre 50 y 75 % del total del tejido testicular) se observa en el estadio de gónada madura con ovocitos vitelogénicos avanzados; esta cantidad de espermatozoides en el lumen del tejido testicular es menor en los estadios gonadales inmaduros y en desarrollo (Fig. 24).

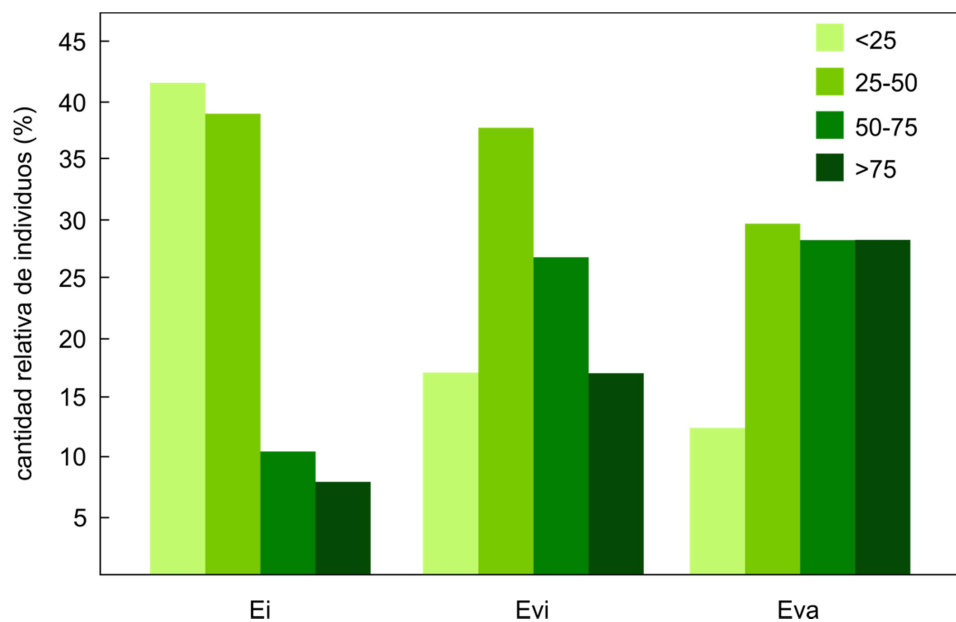


Figura 24. Variación en la cantidad relativa de espermatozoides y su relación con los distintos estadios tejido ovárico. Ei: tejido ovárico sin vitelogénesis; Evi: tejido ovárico con vitelogénesis inicial; Eva: tejido ovárico con vitelogénesis avanzada.

Relación del ciclo gonadal con la temperatura

La temperatura superficial del agua de mar varió sustancialmente durante los periodos de muestreo (setiembre de 2005 a agosto de 2007 y diciembre de 2009 a diciembre de 2011). Los valores de temperatura más bajos para el primer periodo se registraron en agosto (7,7 °C) y los máximos durante febrero (15,9 °C). Por su parte, en el periodo 2009-2011 los valores de mínimos correspondieron a agosto y julio, respectivamente (7 °C) y los máximos en el mes de febrero (16,5 °C).

El análisis de asociación entre el área gonadal total para los dos sitios considerados (CCN y Km 3), el diámetro de los ovocitos y la cantidad relativa de espermatozoides con la temperatura superficial del agua de mar se indica en la Tabla 2. Los resultados permiten ver una correlación negativa entre el área gonadal para ambos sitios (Fig. 25) respecto de la temperatura del agua. Por su parte, el diámetro de los ovocitos y la cantidad relativa de espermatozoides en porcentajes superiores a 75 % no presentan relación significativa con este parámetro ambiental (Fig. 26).

Tabla 2. Correlación no paramétrica de Spearman (R). Análisis de la asociación entre el efecto de la temperatura superficial del agua de mar y el área gonadal total, el diámetro de ovocitos y la cantidad de espermatozoides.

variables	R	p
Área gonadal total CCN	-0,61	<0,05
Área gonadal total Km 3	-0,55	<0,05
Diámetro de ovocitos	-0,03	0,88
Cantidad de espermatozoides	0,18	0,07

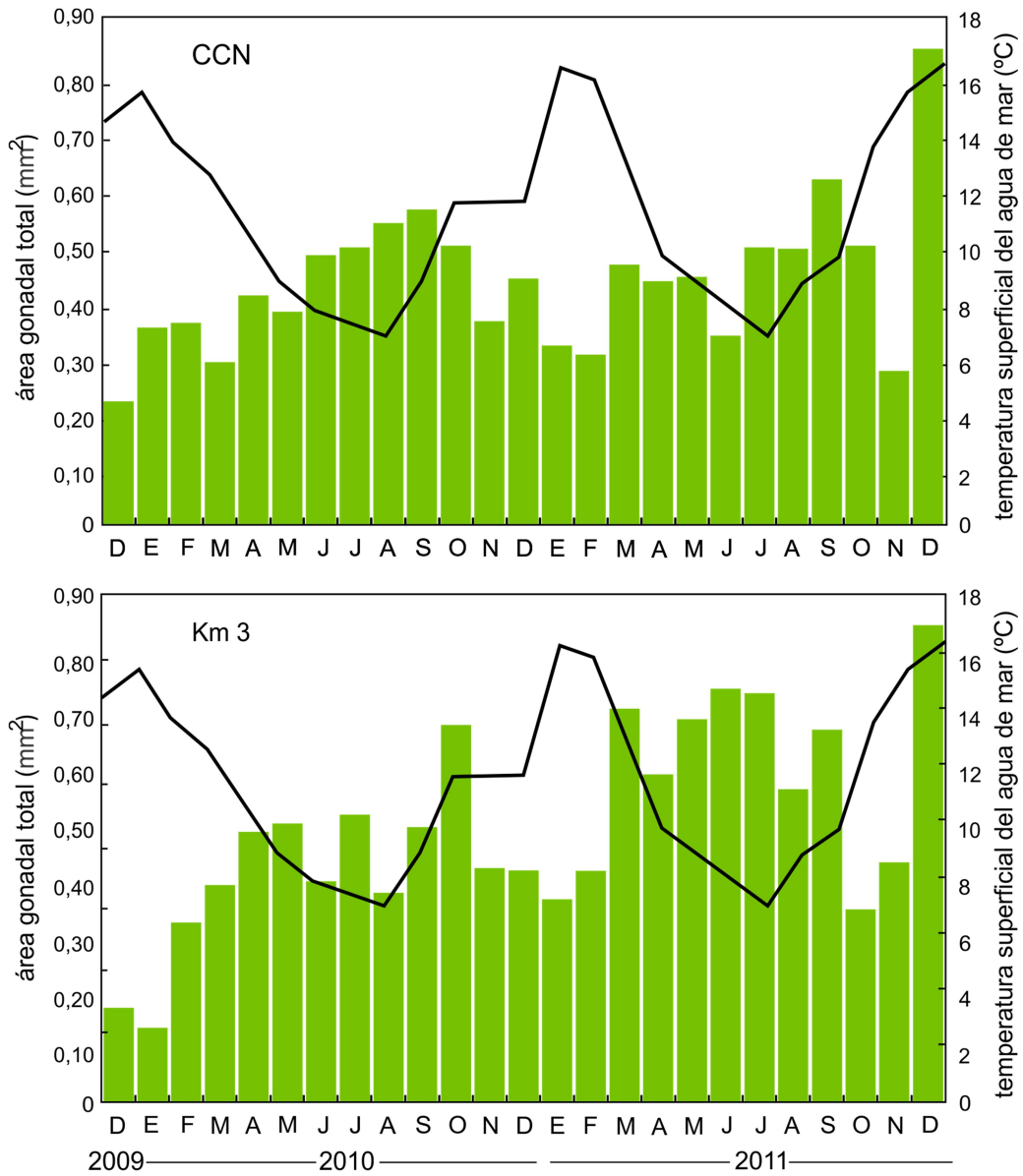


Figura 25. Relación entre la variación temporal del área gonadal total para CCN y Km 3 respecto de la temperatura superficial del mar.

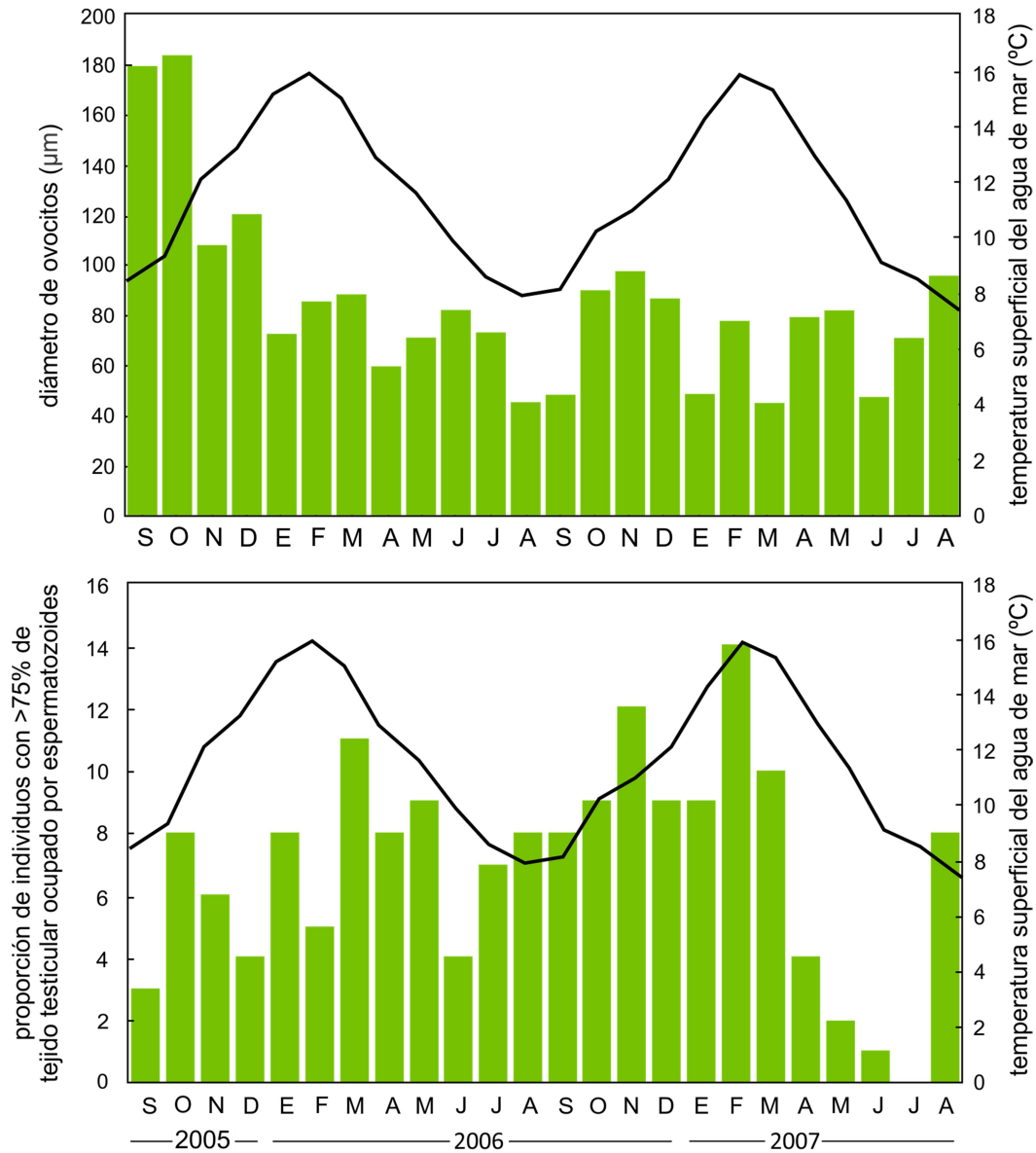


Figura 26. Relación entre la variación temporal del diámetro de ovocitos y la cantidad relativa de espermatozoides en el tejido testicular expresada mediante los mayores porcentajes (>75) respecto de la temperatura superficial del mar.

DISCUSIÓN

Consideraciones sobre la morfología de la gónada y los gametos

Los ejemplares de *Lasaea* en la costa del Golfo San Jorge analizados en este trabajo son todos hermafroditas, coincidiendo estas observaciones con lo descrito para otras especies del género (Oldfield 1955, 1961; Ó Foighil 1985, 1987, 1988; Beauchamp 1986; Crisp y Standen 1988; Tyler-Walters y Crisp 1989; Tyler-Walters y Davenport 1990; Ó Foighil y Thirirot-Quévieux 1991; Tyler-Walters y Hawkins 1995) y, en general, para los representantes de la superfamilia Galeommatoidea (Ó Foighil 1985; Jespersen y Lützen 2006; Fox *et al.* 2007; Dias-Passos y Domaneschi 2009).

Los antecedentes sobre el ciclo gonadal en *Lasaea* no son muchos. En tal sentido, Beauchamp (1986) describe distintos momentos en el desarrollo del ovotestis a partir del análisis histológico de ejemplares de *L. subviridis*. En su trabajo hace referencia a cuatro estadios de desarrollo gonadal diferentes: (1) inmaduro, (2) en desarrollo, (3) maduro y (4) gónada vacía, con ovocitos previtelogénicos desde 10 μm de diámetro hasta ovocitos maduros de unos 300 μm . El mismo autor menciona en su trabajo la presencia de ovocitos, generalmente todos en un mismo estado de desarrollo y unidos a la pared del ovotestis; en algunos casos en que la vitelogénesis se halla muy avanzada, los ovocitos se separan y se observan en forma desordenada en el lumen del saco gonadal.

Los resultados encontrados en las costas patagónicas muestran resultados semejantes a los encontrados para *L. subviridis*. En este sentido, se describe macroscópicamente un ovotestis con dos lóbulos de aspecto blanquecino opaco; a partir de los cortes histológicos, se puede ver un saco gonadal formado internamente por un epitelio germinal con zonas diferenciables: dos lóbulos anteriores donde desarrollan los ovocitos y una zona posterior que une estos lóbulos y donde se puede observar el desarrollo de los gametos masculinos.

Además del género *Lasaea*, la presencia de un ovotestis entre los bivalvos veneroideos ha sido reportada por varios autores; en algunos casos,

como *Pisidium*, *Sphaerium*, *Musculium* y *Tellimya* como hermafroditas simultáneos (Zelaya e Ituarte 2012; Bernal et al. 2015), mientras que en otros géneros como *Mysella*, *Entovalva*, *Waldo* y *Ruditapes* como hermafroditas secuenciales (Petersen y Lützen 2008; Lützen et al. 2011; Lee et al. 2012; Valentich-Scott et al. 2013).

En especies hermafroditas simultáneas se ha indicado una baja proporción en la gónada masculina respecto de la fracción femenina y con escasa producción de espermatozoides (Beauchamp 1986; Eckelbarger et al. 1990; Jespersen y Lützen 2006; Petersen y Lützen 2008).

Los trabajos llevados a cabo sobre reproducción en *Lasaea rubra* y *L. subviridis* indican que se trata de especies hermafroditas simultáneas, con una fracción masculina cercana a 10 % del total de la gónada y poca cantidad de espermatozoides maduros (algunos cientos) (Ó Foighil 1985, 1988; Beauchamp 1986; Mc Grath y Ó Foighil 1986; Ó Foighil y Eernisse 1988). A diferencia de lo antes citado, *L. australis* resulta ser una especie hermafrodita secuencial con una importante proporción de tejido testicular respecto del volumen gonadal total (~50 %) (Ó Foighil 1988).

Heath (1979) sugiere que esta baja superposición de recursos en la formación de gametos puede otorgar ventajas adaptativas a aquellos organismos hermafroditas autofecundantes. Oldfield (1963), por su parte, al comparar la reproducción de diferentes especies de galeomátidos, encuentra una cierta relación entre la cantidad de ovocitos en el tejido ovárico, el tamaño del ovocito maduro y la cantidad de vitelo; de esta manera, en aquellas especies donde se contaron unos pocos ovocitos maduros, con diámetros entre 170-300 μm , la cantidad de vitelo fue importante. De acuerdo al mismo autor, esta situación se puede observar en especies del género *Turtonia* y *Lasaea* que liberan sus crías como pequeños adultos, suprimiendo el estado libre de velíger.

Los resultados encontrados en ejemplares patagónicos de *Lasaea*, en general no difieren de las descripciones de ovotestis realizadas por otros autores en otras especies, como *L. rubra* (Ó Foighil y Eernisse 1988; Oldfield 1955, 1963) y *L. subviridis* (Ó Foighil 1985; Beauchamp 1986). Las localidades

analizadas presentan un desarrollo ovocitario con escasos ovocitos maduros, de gran tamaño e importante cantidad de vitelo. Los diámetros medios encontrados en este trabajo coinciden con lo reportado para el género por Oldfield (1963) y Beauchamp (1986). Resultan particularmente interesantes los microtúbulos observados a partir de los cortes histológicos, formando un huso acromático en ovocitos vitelogénicos (células $>180 \mu\text{m}$ de diámetro y con gran cantidad de vitelo) (Fig. 14), lo que hace suponer que se trata de ovocitos secundarios, que han iniciado la segunda división meiótica; proceso característico para la formación de gametos para una reproducción sexual. En lo que se refiere al análisis de la porción masculina en el ovotestis, a pesar de haberse registrado una escasa cantidad de espermatozoides maduros al igual que en otras especies de *Lasaea*, el área para el desarrollo de los gametos masculinos (~30 % del total de la gónada) resultó superior a la mencionada por Ó Foighil (1985). La presencia de espermatozoides entre los intersticios registrada aquí (Fig. 15) fue también observada en otras especies de *Lasaea* (Ó Foighil 1985).

De acuerdo a algunos trabajos los bivalvos de la superfamilia Galeommatoida presentan estructuras variadas en sus espermatozoides, siendo una excepción a la característica conservada de los bivalvos en general (Eckelbarger *et al.* 1990). Ó Foighil (1985) y Mc Grath y Ó Foighil (1986) describen para *L. subviridis* y *L. rubra*, respectivamente, la morfología de los espermatozoides observados a partir de cortes histológicos y en material fresco. En ambos casos, hacen referencia a algunas características atípicas encontradas. En las descripciones, los autores mencionan un espermatozoide de cabeza esférica o ligeramente elipsoidal con un diámetro que varía entre 6,3-10,2 μm en un caso y entre 7-8,5 μm en el otro. Para las dos especies, los autores coinciden al indicar que los espermatozoides tienen un flagelo simple de aproximadamente 45 μm , más corto que el flagelo típico de un espermatozoide primitivo (Ó Foighil 1985). Resultan interesantes las características morfológicas encontradas en los espermatozoides de *Lasaea* de las costas del Golfo San Jorge. A partir de la observación del tejido gonadal fresco, se pudieron diferenciar en escasa cantidad espermatozoides móviles,

de cabeza redondeada o ligeramente ovalada con un acrosoma prominente. La forma de la cabeza es semejante a la descrita para *L. rubra* y *L. subviridis* por Ó Foighil (1985) y Beauchamp (1986); sin embargo, en los ejemplares patagónicos el rango de tamaño fue algo menor (entre 5-5,5 μm) respecto de lo publicado para otras especies de *Lasaea*.

Una particularidad no citada hasta el momento en el género *Lasaea*, es la presencia de dos flagelos encontrados en los ejemplares patagónicos, ambos móviles; la longitud de los flagelos es distinta entre sí e incluso el flagelo más largo (medida considerada desde la base de la cabeza) resultó de menor longitud que lo expresado por Ó Foighil (1985) y Beauchamp (1986) de 35-45 μm para *L. subviridis*.

Espermatozoides biflagelados se han encontrado en varios taxones de invertebrados: platelmintos rabdocelos (Watson 1999), digeneos (Kitajima *et al.* 1976), poliquetos (Franzén 1983) e insectos (Trueman 1999; Dallai *et al.* 2001). Entre los moluscos, espermatozoides biflagelados se reportaron sólo en los bivalvos venéridos *Corbicula fluminalis*, *C. fluminea*, *C. australis*, *C. leana* (Konishi *et al.* 1998; Byrne *et al.* 2000; Korniuschin 2004; Pigneur *et al.* 2012). Entre las especies hermafroditas andrógenas del género *Corbicula*, los ovocitos son fertilizados por espermatozoides biflagelados que no presentan una meiosis reduccional (Pigneur *et al.* 2012). El significado adaptativo del número de flagelos es un tema no resuelto y se ha sugerido que la movilidad de los espermatozoides está sometida a una fuerte selección, principalmente en aquellos casos donde la hembra puede ser fertilizada por varios machos (Pitnick *et al.* 2008). Estos mismos autores plantean una nueva hipótesis de conjugación en espermatozoides, indicando una ventaja evolutiva en los espermatozoides multiflagelados en varias especies. Si bien la información sobre conjugación de espermatozoides es escasa, el fenómeno se ha registrado en algunos grupos taxonómicamente separados, y podría favorecer la unión física de uno o más flagelos para incrementar la motilidad del espermatozoide (Pitnick *et al.* 2008).

Los resultados encontrados hasta el momento en ejemplares patagónicos de *Lasaea* indican un tejido gonadal masculino con algunas

características compatibles con un desarrollo de gametos viables, con espermatozoides móviles y un acrosoma prominente; por otra parte, la presencia de dos flagelos se correspondería con la descripción general de espermatozoides no funcionales. Futuros trabajos sobre la ultraestructura de los gametos masculinos permitirían una mejor interpretación del rol que cumplen los espermatozoides en la reproducción de los ejemplares de *Lasaea* en Patagonia.

Interpretación del ciclo gonadal

La gametogénesis y cambios en el ciclo reproductivo de los bivalvos a través del tiempo, ha sido objeto de estudio en numerosas especies. El conocimiento de los cambios que ocurren durante el desarrollo gonadal, resulta de gran importancia para adquirir un mayor entendimiento de las poblaciones y la biología general de una especie, a fin de conocer la implicancia que éstas tengan dentro de las comunidades (Ortiz-Galarza *et al.* 2011). Las condiciones generales de incubación y desarrollo de larvas constituyen un punto esencial para el estudio de la reproducción en invertebrados marinos (Thorson 1950). Los patrones reproductivos en bivalvos en general, están aún poco estudiados. En particular, los sistemas costeros se caracterizan por bivalvos pequeños, que en su mayoría no tienen valor económico y, en consecuencia, no resultan prioritarios para las investigaciones sobre su biología a pesar de su abundancia e influencia en el ecosistema (Le Pennec y Beninger 2000). Los factores ambientales cíclicos (temperatura, fotoperíodo, tipo y ciclo de mareas, abundancia de fitoplancton, salinidad), característicos de cada zona, tienen importante influencia en los sistemas litorales y pueden funcionar como señales para desencadenar eventos reproductivos (Le Pennec y Beninger 2000; Rybalkina *et al.* 2013).

Resulta común que los bivalvos presenten en ambientes templados ciclos reproductivos anuales con una gametogénesis seguida de uno o varios eventos de desove y una etapa final de recuperación gonadal; el número de eventos de desove y la duración de cada uno varía según la especie y las condiciones ambientales (Gosling 2003; Crnčević *et al.* 2013); aunque se han

registrado ciclos reproductivos en bivalvos que se apartan de las generalidades (Vinuesa, 1981).

Los resultados obtenidos en las dos localidades patagónicas (CCN y Km 3) muestran, a partir de analizar los tamaños gonadales, un ciclo estacional con periodos de desove principal para los meses de verano (enero-febrero) y un desove menor durante junio-julio (2006) y abril (2007), con una posterior recuperación en cada caso. Al considerar los distintos estadios gonadales femeninos, se observa un patrón irregular pero que permite apreciar en general un desarrollo del tejido ovárico continuo. El tejido ovárico en estado de vitelogénesis avanzada muestra disminuciones en sus frecuencias durante los meses estivales en los dos años de muestreo y en los meses de invierno para el primero y otoño para el segundo año. La disminución de frecuencias de este estadio del tejido ovárico y consecuente incremento en la frecuencia del tejido ovárico en estado inicial, estaría indicando dos periodos de desove por año.

Oldfield (1963) encuentra para *L. rubra* evidencias de más de un desove en los meses de verano, ya que los individuos analizados se encontraron con embriones en la cámara suprabranquial y con un estado avanzado en el desarrollo de la gónada (ovocitos maduros y activa espermatogénesis). En algunos trabajos sobre la dinámica poblacional de *L. rubra*, se sugiere una estructura unimodal y en algunos casos bimodal, lo que coincidiría con lo propuesto por Oldfield sobre una reproducción anual estacional, eventualmente con un segundo pico en el reclutamiento (Seed y O'Connor 1980; Mc Grath y Ó Foighil 1986). Por su parte, Iwasaki (1996) encuentra en *L. undulata* de las costas de Hong Kong, un ciclo anual con una marcada época reproductiva desde inicio de primavera hasta comienzos del otoño y dos picos de desove al iniciar la primavera y mediados de verano respectivamente. Beauchamp (1986), por su parte, encuentra un ciclo reproductivo continuo para *L. subviridis* de la costa californiana. El autor hace mención a la presencia de ovocitos vitelogénicos durante todo el año; sin embargo, en su investigación encuentra que individuos pequeños (< 1,9 mm de talla) tienen en su mayoría ovocitos de menor diámetro que aquellos adultos de mayor talla (2-3 mm); en ellos se observó una distribución más uniforme en el diámetro de los ovocitos

vitelogénicos, encontrándose dentro de la misma gónada en similar frecuencia distintos tamaños de gametos femeninos.

Con referencia a la variación temporal en la vitelogénesis de los ovocitos en las localidades patagónicas consideradas, se observa en general una distribución unimodal, donde los ovocitos previtelogénicos se pueden encontrar durante todo el año con las mayores frecuencias. Esto afirma la idea de que la etapa de proliferación de ovocitos se encuentra extendida en el tiempo. Los ovocitos con vitelogénesis avanzada, tienen sus máximos en los meses de fines de primavera – principios de verano; estos valores indican que la emisión de huevos hacia las branquias coincide con lo reportado para otras especies de *Lasaea*. Posteriormente a estos meses de mayor producción de ovocitos vitelogénicos, se pueden diferenciar ovocitos previtelogénicos, correspondientes a la fase de posdesove y recuperación de la gónada. Al igual que lo reportado para *L. rubra* (Oldfield 1963; Morton 1992) con dos picos reproductivos por estación, se puede diferenciar un segundo desove de menor importancia durante el período de muestreo en el análisis llevado a cabo en nuestras costas; en este caso, el evento se registró durante los meses de fin de otoño – comienzo del invierno.

Respecto a la espermatogénesis, Beauchamp (1986) analiza el desarrollo en *L. subviridis* y encuentra que los distintos estadios de células germinales masculinas aparecen durante todo el año, en forma coincidente con la presencia continua de ovocitos. Los ejemplares de *Lasaea* estudiados en las costas del Golfo San Jorge presentan un comportamiento equivalente al descrito para *L. subviridis*. La espermatogénesis pudo registrarse durante todo el año en los ejemplares patagónicos. Sin embargo, la frecuencia de individuos con más de 75 % de gónada masculina ocupada por espermatozoides disminuye durante los meses de verano e invierno en los dos años de estudio, suponiendo una evacuación del tejido testicular hacia la cámara suprabranquial. Al comparar estos datos con los estadios gonadales femeninos, se puede apreciar una relación significativa entre la mayor cantidad de espermatozoides en el tejido testicular y el mayor desarrollo del tejido ovárico.

Varios autores coinciden en que, en los bivalvos hermafroditas simultáneos, la fertilización ocurre en las branquias (Thorson 1950, Oldfield 1963; Beauchamp 1986). Los resultados encontrados a partir del análisis histológico en ejemplares patagónicos, sugieren una sincronización en la emisión de gametos hacia la cámara suprabranquial. En el Capítulo III se analizan los patrones de incubación y desarrollo embrionario para *Lasaea* de la costa patagónica lo cual permitirá corroborar los resultados aquí presentados.

Morton (1992) resume la información disponible sobre la reproducción del género *Lasaea*, indicando un desove en verano para *L. rubra* en las costas británicas, *L. r. hinemoa* de Nueva Zelanda y *L. subviridis* del pacífico noreste con un ciclo reproductivo activo durante todo el año y *L. cf. nipponica* de Hong Kong con dos picos de desove, uno en primavera y otro a comienzos del otoño. Este autor deja en evidencia que las diferencias dentro del género están relacionadas con las variaciones ambientales locales. La influencia de la temperatura del agua de mar en la reproducción de invertebrados marinos incluyendo a los bivalvos, ha sido revisada en numerosas ocasiones (Giese 1959; Sastry 1979). De acuerdo a estos autores, en muchas especies el crecimiento de la gónada y la gametogénesis parece ocurrir cuando la temperatura del mar disminuye en los meses de otoño o cuando se incrementa en primavera-verano.

La maduración gonadal en *Lasaea* en las costas del Golfo San Jorge, a pesar de no presentar un patrón claramente definido respecto de la temperatura del agua de mar (ver Tabla 2), muestra un aumento en el tamaño de ovocitos como así también en la cantidad de espermatozoides presentes en la gónada (> 75%) hacia fines de invierno – principio de primavera; este incremento en el desarrollo gonadal estaría dado luego de un periodo de desove en primavera – verano y cuando el tejido comienza su maduración nuevamente hacia fines de verano – otoño, cuando la temperatura del agua de mar disminuye. Asimismo, al ser una especie intermareal y fuertemente asociada a matrices del mejillín *Perumytilus purpuratus* (Zaixso *et al.* 2015) las variaciones microambientales en las mismas podrían afectar aspectos

fisiológicos y acentuar la variabilidad en el patrón reproductivo entre localidades.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

DESARROLLO EMBRIONARIO Y FECUNDIDAD

INTRODUCCIÓN

Los bivalvos son un exitoso grupo de invertebrados marinos, intermareales y submareales, con una importante variedad de estrategias de vida (Ripley y Caswell 2008; Reed *et al.* 2013). Algunas variables ambientales cuando presentan condiciones desfavorables, como la temperatura y disponibilidad de alimento, parecieran ser determinantes para que se desarrollen especies con cuidado parental y la incubación de larvas hasta su emisión como juveniles disminuyendo así la mortalidad (Ramírez-Llodra 2002; Higgs *et al.* 2009). Entre las muchas explicaciones acerca de las causas de cuidado parental en invertebrados de pequeño tamaño, se puede mencionar la hipótesis sobre lo que Strathmann y Strathmann (1982) denominan “alometría”. Estos autores afirman que el mayor cuidado de las crías entre los invertebrados se asocia con un pequeño tamaño del adulto y que esta correlación se puede apreciar en una importante cantidad de taxones marinos. La hipótesis se refiere a la relación que existe entre la producción de huevos y la capacidad interna del adulto para albergar sus larvas; en general, adultos de mayor tamaño producen un volumen de huevos superior a su capacidad de incubación; en consecuencia, el área disponible es limitante (Chia 1974; Strathmann y Strathmann 1982; Kabat 1985; Havenhand 1995).

Los organismos incubadores se caracterizan por producir poca cantidad de huevos lecitotróficos de gran tamaño, a diferencia de la emisión masiva de huevos de menor tamaño en animales no incubadores (Havenhand 1995; Ramírez-Llodra 2002). El desarrollo directo y la producción de huevos lecitotróficos, implica una mayor inversión energética y menor fecundidad respecto de la producción de huevos planctotróficos (Reed *et al.* 2013). Como parte de su hipótesis sobre la correlación entre el tamaño del adulto y la

producción de huevos, Strathmann y Strathmann (1982) sugieren que los organismos de pequeño tamaño no producen huevos planctotróficos ni lecitotróficos en gran número, superando su capacidad de carga, sin garantizar su supervivencia. En su lugar, estos animales incuban una escasa cantidad de huevos grandes con gran cantidad de vitelo.

Tanto la incubación de larvas como la emisión de huevos son estrategias reproductivas que se pueden observar entre los bivalvos de ambientes variados (Ripley y Caswell 2008). Para algunos autores, las evidencias fósiles indicarían que los primeros moluscos fueron relativamente pequeños y, en consecuencia, basados en la teoría alométrica de Strathmann y Strathmann (1982), se trataría de especies incubadoras con larvas lecitotróficas (Chafee y Lindberg 1986). Para otros autores, esta es una característica especializada principalmente entre los bivalvos (Dias-Passos y Domaneschi 2009) y se puede observar en unas cuantas familias de eulamelibranquios (Oldfield 1963) y protobranquios (Ockelmann y Warén 1998). En la historia de vida de una especie, la energía invertida en la reproducción tiene importantes consecuencias en la dinámica poblacional. Las variables implicadas se refieren a la tasa de crecimiento, edad y talla de madurez, variabilidad en la fecundidad y mortalidad, tamaño de los huevos, esfuerzo reproductivo por edad y tamaño, tipo de desarrollo larval y edad máxima reproductiva de los adultos (Ramírez-Llodra 2002).

Los bivalvos de la superfamilia Galeommatoidea en general son animales de pequeño tamaño que incuban sus larvas hasta un avanzado estado de desarrollo (Dias-Passos y Domaneschi 2009). En un detallado trabajo sobre algunos representantes de la superfamilia (entre ellos *L. rubra*), Oldfield (1963) observa casos extremos en la incubación, con una importante producción de huevos pequeños (25 μm de diámetro) y poco vitelo, mientras que, en otros organismos, la producción de huevos es más escasa, de mayor diámetro (170-300 μm) y, por ende, gran cantidad de vitelo. En el primer caso, el autor encuentra que las larvas son emitidas como velígeres, mientras que en el segundo se liberan juveniles completamente formados. A excepción de *L. australis*, que presenta un estadio larval planctónico (Ó Foighil 1988), en el género *Lasaea* el estado libre de velíger se ha suprimido; las larvas se incuban

en la cámara suprabranquial y se liberan como juveniles (Oldfield 1955; Booth 1979). Especies incubadoras del género *Lasaea* han sido encontradas en todos los continentes y gran número de islas oceánicas; de esta manera se hace referencia a especies con una mayor distribución geográfica que sus congéneres planctotróficos sugiriendo, además, que una fecundación cruzada con liberación de larvas velíger al agua, resulta una estrategia menos exitosa para la colonización de nuevas áreas (Ó Foighil 1989).

De acuerdo a trabajos basados en técnicas moleculares, en *Lasaea* la brecha evolutiva entre las especies incubadoras y la única planctotrófica descrita hasta el momento es relativamente corta (entre 6 y 7 millones de años) si se compara con lo que ocurre en otras familias como Corbiculidae, Sphaeriidae y Unionidae (Ó Foighil y Smith 1995; Ó Foighil y Josefowicz 1999; Altnöder y Haszprunar 2008). Según Altnöder y Haszprunar (2008) en su investigación sobre *L. adansoni*, la especie exhibe modificaciones muy marcadas en el desarrollo donde la morfología larval típica de los bivalvos se ve alterada. Los mismos autores señalan que, dado que *L. australis* muestra aún un desarrollo característico de bivalvos planctotróficos, el conocimiento sobre el desarrollo de *L. adansoni* podría servir como antecedente para interpretar cambios sustanciales en la ontogenia que se manifiestan en poco tiempo.

El objetivo general de este capítulo es analizar el desarrollo larval de *Lasaea* en la costa central del Golfo San Jorge, a partir de lo cual se espera: (1) describir los distintos estadios embrionarios; (2) analizar la talla de primera incubación; (3) interpretar la variación temporal en la proporción de animales incubando; (4) estudiar los factores que afectan la incubación (talla del adulto, temperatura del agua de mar, cantidad de horas de luz, localidad); (5) analizar la relación entre la talla del adulto y el número máximo de animales incubando; (6) analizar la fecundidad inicial y la final, y (7) examinar la variación temporal de los estadios embrionarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

Las muestras para analizar el desarrollo embrionario de *Lasaea* en costas patagónicas, fueron las mismas recolectadas en las playas de Caleta Córdova norte (CCN) y Km 3 para el análisis del ciclo gonadal descrito en el Capítulo III.

Al igual que lo explicado en el capítulo anterior, las muestras se recolectaron en el mejillinar del mesolitoral medio (nivel 2,40 m), en sitios de baja pendiente. Se recolectaron en forma mensual aproximadamente 50 individuos con tallas superiores a 1 mm, desde diciembre de 2009 a diciembre de 2011 en cada una de las localidades antes mencionadas (CCN: n = 1.253, Km 3: n = 1.251). Los individuos fueron mantenidos en acuario con agua de mar recolectada para tal fin en una zona aledaña a la ciudad de Comodoro Rivadavia hasta su procesamiento en el laboratorio durante uno o dos días, con temperatura controlada simulando la temperatura superficial del agua correspondiente al periodo en que se tomaron las muestras hasta su observación y alimentados con cultivo de *Tetraselmis* sp. A partir de estas muestras, se analizó la talla de primera incubación en cada localidad, considerando un rango de tallas de 1 a 3,5 mm.

Los individuos fueron mantenidos en acuario; la temperatura en acuario se mantuvo controlada; los ejemplares fueron alimentados con cultivo de *Tetraselmis* sp. provisto por el cepario de microalgas de la UNPSJB

Procedimientos de laboratorio

1. Observación de ejemplares patagónicos de *Lasaea*

En laboratorio, se analizaron las muestras recolectadas mensualmente y mantenidas en agua de mar; los individuos fueron medidos bajo microscopio estereoscópico (Zeiss STEMI DV4) con ocular graduado ($\pm 0,01$) y se diseccionaron a fin de registrar el grado de desarrollo en cada caso de acuerdo a sus características: (1) talla, (2) actividad de incubación de los adultos con o

sin embriones, (3) número de embriones en las branquias en caso de estar incubando, (4) estadio embrionario. La caracterización de los estadios se realizó de acuerdo a las descripciones de Altnöder y Haszprunar (2008) para *L. adansonii* con modificaciones, considerando los siguientes estadios: (1) estadio de huevos y embriones iniciales (H+E0); (2) estadio embrionario 1 (E1); (3) estadio embrionario 2 (E2); (4) estadio embrionario 3 (E3); (5) estadio embrionario 4 (E4) y (6) juveniles de vida libre (J). Los análisis sobre incubación, se realizaron con los datos correspondientes a los estadios de huevo/embriones (H+E0) hasta estadio de juveniles próximos a ser liberados (E4).

Los estadios embrionarios se registraron con una cámara digital OLYMPUS U-TVO 5X-C3 conectada a un microscopio estereoscópico OLYMPUS SZX16.

Análisis de los datos

Se registraron las tallas mínimas y máximas de animales incubando para las dos localidades; a fin de determinar la talla de primera incubación, se realizó una regresión logística dada la naturaleza binaria de los datos (presencia/ausencia de incubación) para los ejemplares de CCN y Km 3. Se estimó la menor talla a partir de la cual el 50% de los individuos comienza a incubar.

Se examinaron las variaciones temporales en la proporción de animales incubando para cada una de las localidades (CCN y Km 3). A fin de analizar el efecto de variables explicativas como la temperatura superficial del agua de mar, la cantidad de horas de luz, localidad y tamaño corporal sobre la proporción de animales incubando, se realizó una regresión logística múltiple. Se aplicaron métodos de selección de variables hacia adelante (*forward*) (Agresti 2007).

La relación potencial ($y=a.x^b$) entre la talla del adulto y el número de embriones (E0+E1) en la cámara suprabranquial fue analizada mediante una regresión lineal obtenida a partir de la transformación logarítmica de la variable dependiente (número de embriones) y la variable respuesta (talla) (Gould 1966;

Hines 1982); para ello, se tuvieron en cuenta animales que estuvieran incubando. Un valor en la pendiente (b , coeficiente de alometría) igual a 3 indica la existencia de una relación isométrica entre la talla (variable lineal) y el número de huevos (variable volumétrica) indicando que el número de embriones incubando aumentará isométricamente respecto a la talla del animal adulto; en tanto que un valor de pendiente $b > 3$ permitió considerar una relación alométrica positiva entre las variables, indicando que el número de embriones incubando está relacionado con el volumen disponible en la cavidad de incubación que posean los adultos (Gould 1966; Beekey y Hornbach 2004; Litulo 2005). Para evaluar cambios en la fecundidad entre sitios y pérdidas en el número de huevos/embriones durante el proceso de incubación se analizó la fecundidad al inicio y final del periodo de incubación en ambas localidades. Para esto se llevó a cabo un análisis de covarianza (ANCOVA), considerando la localidad y el periodo como efectos principales y la talla del adulto como covariable. Para el estadio inicial de desarrollo, se consideraron los estadios H+E0 y E1 juntos, en tanto que para el periodo final de desarrollo se consideraron los estadios E3 y E4 sumados. Se corroboraron los supuestos de homogeneidad de pendientes, homogeneidad de varianzas y normalidad (Quinn y Keough 2002).

La variación mensual de la proporción de distintos estadios embrionarios en cada una de las dos localidades (CCN y Km 3), se analizó mediante una prueba exacta de χ^2 de Pearson con permutaciones de Monte Carlo (Lynch *et al.* 1991).

Los análisis de regresión logística se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS 17. Para el análisis estadístico de ANCOVA, se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 7.0 (Statsoft), en tanto que las pruebas exactas de χ^2 de Pearson se realizó mediante el programa estadístico StatXact 9.0 (Cytel Studio). En todos los casos se contempló un nivel de significación de 5 %.

RESULTADOS

Los bivalvos patagónicos de *Lasaea* incuban sus embriones hasta liberarlos como juveniles (Fig. 27). En general, todos los estadios de huevos/embriones tienen una coloración blanca opaca semejante al ovotestis con diferencias morfológicas según su estado de desarrollo. La segmentación es holoblástica y espiral, ligeramente desigual, con huevos con gran cantidad de vitelo. En las distintas etapas de segmentación, el núcleo celular se observa en forma marginal (Fig. 28).

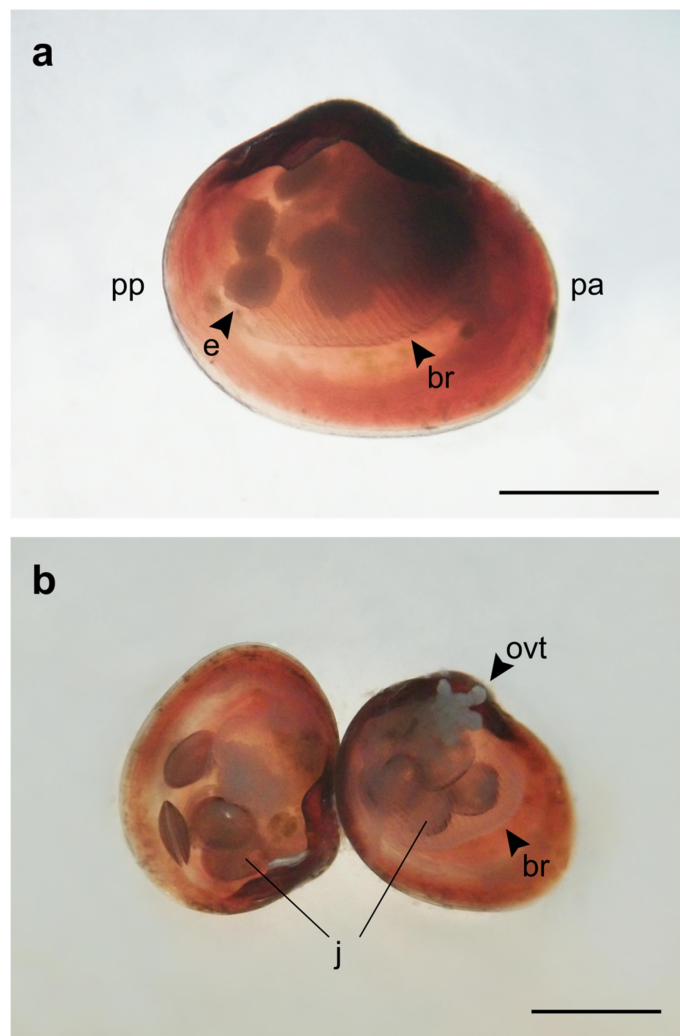


Figura 27. a) *Lasaea* patagónica con embriones; b) juveniles en la cámara suprabranquial próximos a ser liberados. br: branquia; e: embriones; j: juveniles próximos a ser liberados; ovt: ovotestis; pa: parte anterior; pp: parte posterior. Escalas 1 mm.

Descripción de los distintos estadios

- (1) Huevos y Embriones iniciales (H + E0): Estadio formado por huevos sin segmentar y segmentados sin desarrollo de valva, con un diámetro mínimo de 250 μm y máximo de 350 μm (\bar{x} = 310 \pm 20 μm ; n=112). En el estadio de huevo (Fig. 28a) las células son esféricas, de coloración blanquecina. En la Figura 28 b-g se aprecian las distintas etapas de segmentación holoblástica y espiralada típica en la mayoría de los moluscos, a excepción de los cefalópodos; no se observan estructuras ciliadas características de larva trocófora. Hasta las primeras etapas de división, es posible observar una membrana de fertilización de aspecto transparente rodeando las células (Fig. 29).
- (2) Estadio 1 (E1): En esta etapa los embriones comienzan a formar la conchilla, todavía sin coloración y distinguible del resto del embrión sólo por una textura más arrugada y brillante correspondiente a la protoconcha 1. Se aprecia una masa de tejido en diferenciación ("*cephalic*" mass, según Oldfield 1963) que adquiere una forma arriñonada con un blastoporo distinguible en la parte ventral (Fig. 30a). La valva aparece como dos placas ligeramente ovaladas unidas en la zona del ligamento (Fig. 30b y Fig. 31); el aumento de contraste en las imágenes, permite visualizar un borde en la conchilla de tonalidad más oscura que se corresponde con la prodisoconcha I (Fig. 30a). El largo de las valvas medidas bajo microscopio estereoscópico varió entre 150 μm y 350 μm (\bar{x} = 254 \pm 77 μm ; n=25).
- (3) Estadio 2 (E2): La valva continúa siendo de color blanquecino traslúcido, de apariencia más lisa que en E1, sin esculturas apreciables a la lupa. El largo varía entre 200 μm y 350 μm (\bar{x} = 303 \pm 64 μm ; n=64) y contiene aproximadamente la mitad de la masa tisular en diferenciación; aún es posible diferenciar el blastoporo (Fig. 30c).
- (4) Estadio 3 (E3): Este estadio se diferencia del anterior principalmente por la presencia de una valva más grande con un rango entre 350 μm y 500 μm de largo (\bar{x} = 468 \pm 54 μm ; n=70); a su vez, este estadio difiere de E2 en que el cuerpo se encuentra contenido casi en su totalidad dejando poca

masa tisular al descubierto, sin que se evidencien estructuras diferenciadas características de un individuo juvenil o adulto (Fig. 30d).

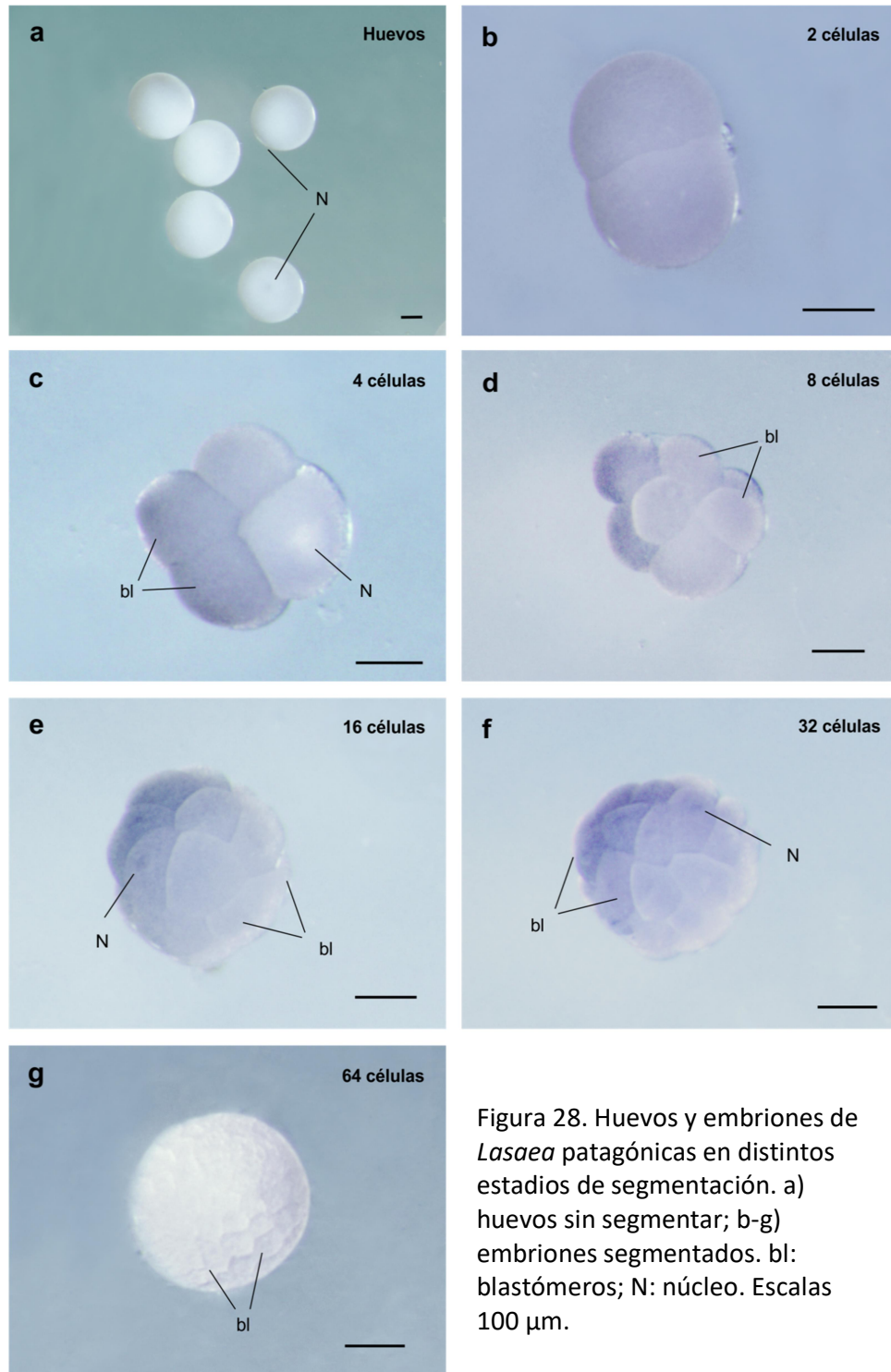


Figura 28. Huevos y embriones de *Lasaea patagónica* en distintos estadios de segmentación. a) huevos sin segmentar; b-g) embriones segmentados. bl: blastómeros; N: núcleo. Escalas 100 μm.

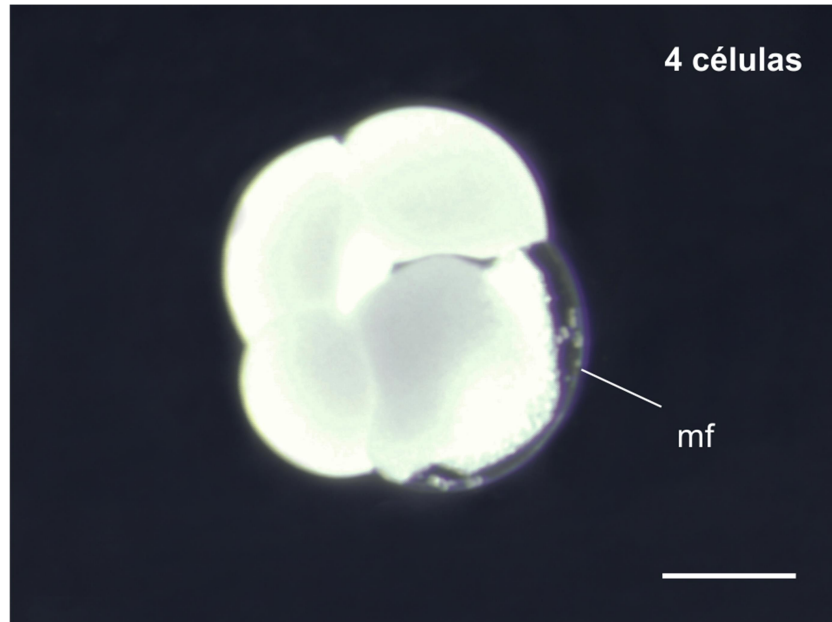


Figura 29. Embrión en estadio de cuatro células donde se diferencia la membrana de fertilización (mf). Escala 100 μm .

- (5) Estadio 4 (E4): Estadio formado por larvas-D y juveniles próximos a ser liberados; las larvas-D presentan una conchilla, de aspecto frágil y traslúcido que comienza a adquirir la coloración típica de los adultos, principalmente en la zona de la charnela; es posible distinguir por transparencia estructuras características bien formadas como las branquias y el pie; la totalidad del cuerpo se encuentra contenido entre las valvas que varían entre 400 μm y 650 μm (\bar{x} = 550 \pm 75 μm ; n=148) (Fig. 30e). Cuando se encuentran próximos a ser liberadas al medio, presentan aspecto de juvenil con el umbo completamente formado (Fig. 30f).
- (6) Juveniles (J): los ejemplares juveniles analizados se caracterizan por presentar una coloración algo más intensa que aquellos próximos a ser liberados por los adultos de la cámara suprabranquial; las tallas medidas en juveniles de vida libre rondan entre 0,75 μm y 1 mm (\bar{x} = 0,96 \pm 0,09 mm; n=30), con un desarrollo de los órganos completo a excepción de las gónadas.

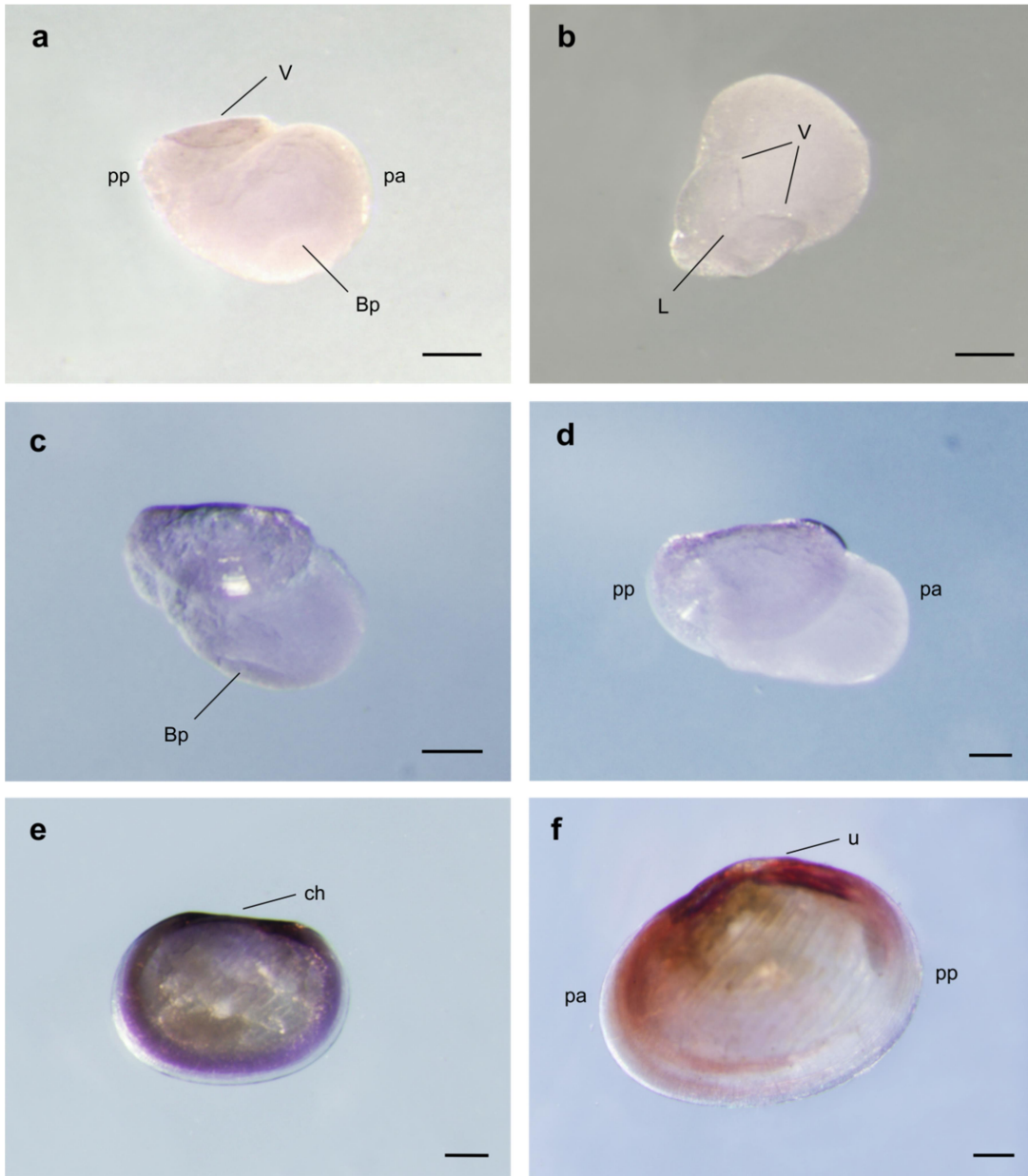


Figura 30. Estadios larvales de *Lasaea* patagónicas en desarrollo. a-b) E1; c) E2; d) E3; e) larva-D (E4); f) juvenil próximo a ser liberado (E4). bp: blastoporo; ch: charnela; pa: parte anterior; pp: parte posterior; u: umbo; v: valva. Escala 100 μ m.



Figura 31. Detalle de la valva en desarrollo en el estadio E1 fotografiada con MEB. a) desarrollo de valva incipiente; b) desarrollo valvar más avanzado. v; valva. Escala 50 μm .

Análisis del ciclo embrionario

Talla primera incubación

El análisis de regresión logística para las localidades consideradas indica variabilidad en la talla de primera incubación ($T_{50\%}$) en cada caso. En CCN se encontraron individuos incubando en un rango de tallas que varía entre 1,55 mm y 2,93 mm ($\bar{x}=2,17 \pm 0,26$ mm; $n=1.211$) con una $T_{50\%}$ estimada en 1,72 mm. Por su parte, los ejemplares de Km 3 que se encontraron con embriones en las branquias, variaron en un rango de tallas entre 1,9 mm y 3 mm ($\bar{x}=2,38 \pm 0,30$ mm; $n=1.235$) con $T_{50\%}$ estimada en 2,1 mm (Fig. 32).

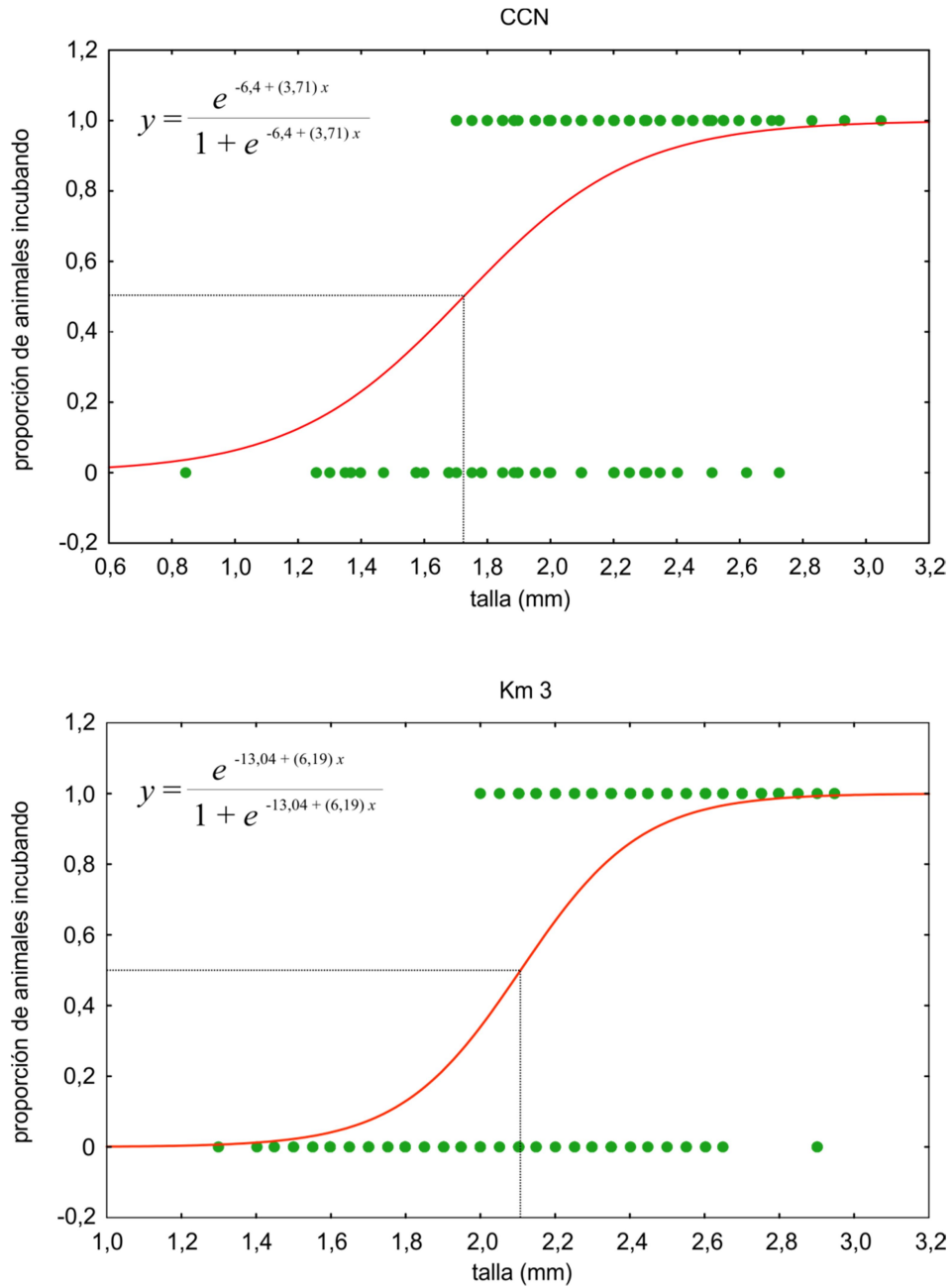


Figura 32. Modelo de regresión logística para determinar la talla de primera incubación ($T_{50\%}$) en ejemplares de CCN y Km 3.

Variaciones temporales en la proporción de animales incubando y su relación con factores ambientales

En las dos localidades consideradas se encontraron animales incubando durante todo el año, a excepción de febrero de 2010 y los meses de mayo, agosto y setiembre de 2011 donde no se registraron ningún caso en Km 3, y el mes de setiembre de 2010 en CCN. En ambas localidades, la mayor proporción de animales incubando se registra hacia fines de primavera y comienzo de verano en 2010 y 2011, con una importante disminución desde fin de verano – comienzo de otoño durante los dos años de muestreo, principalmente para Km 3; en CCN, esta disminución en la proporción de animales incubando resulta más gradual (Fig. 33). En las dos localidades, los valores de animales incubando se incrementan nuevamente durante los meses de primavera – verano, registrando un pequeño aumento en invierno (julio) de 2010 para Km 3.

Los resultados de la regresión logística múltiple indican que la localidad, cantidad de horas de luz, temperatura del agua de mar y talla tienen un efecto significativo sobre la proporción de animales incubando ($\chi^2=377,54$; $p<0,0001$; $n=2.504$) (Tabla 3). Se observa una relación positiva de la cantidad de horas de luz y la talla del adulto en la proporción de individuos incubando. Con respecto a la temperatura, el análisis arroja una relación negativa indicando que la máxima proporción de individuos en incubación ocurre antes de las temperaturas máximas del agua de mar (Fig. 33).

Tabla 3. Regresión logística múltiple. Efecto del tamaño corporal, localidad, cantidad de horas de luz y temperatura del agua de mar, sobre la proporción de animales incubando.

Efecto	b	ES	Wald χ^2	gl	p	Exp(b)	LC 95%	
							inf.	sup.
Localidad	-0,74	0,12	35,96	1	<0,0001	0,48	0,38	0,61
Horas luz	0,60	0,06	119,98	1	<0,0001	1,84	1,64	2,05
T°	-0,12	0,04	9,86	1	0,002	0,82	0,82	0,96
Talla	1,26	0,20	37,37	1	<0,0001	2,35	2,35	5,26
Constante	-10,48	0,66	254,72	1	<0,0001	0		

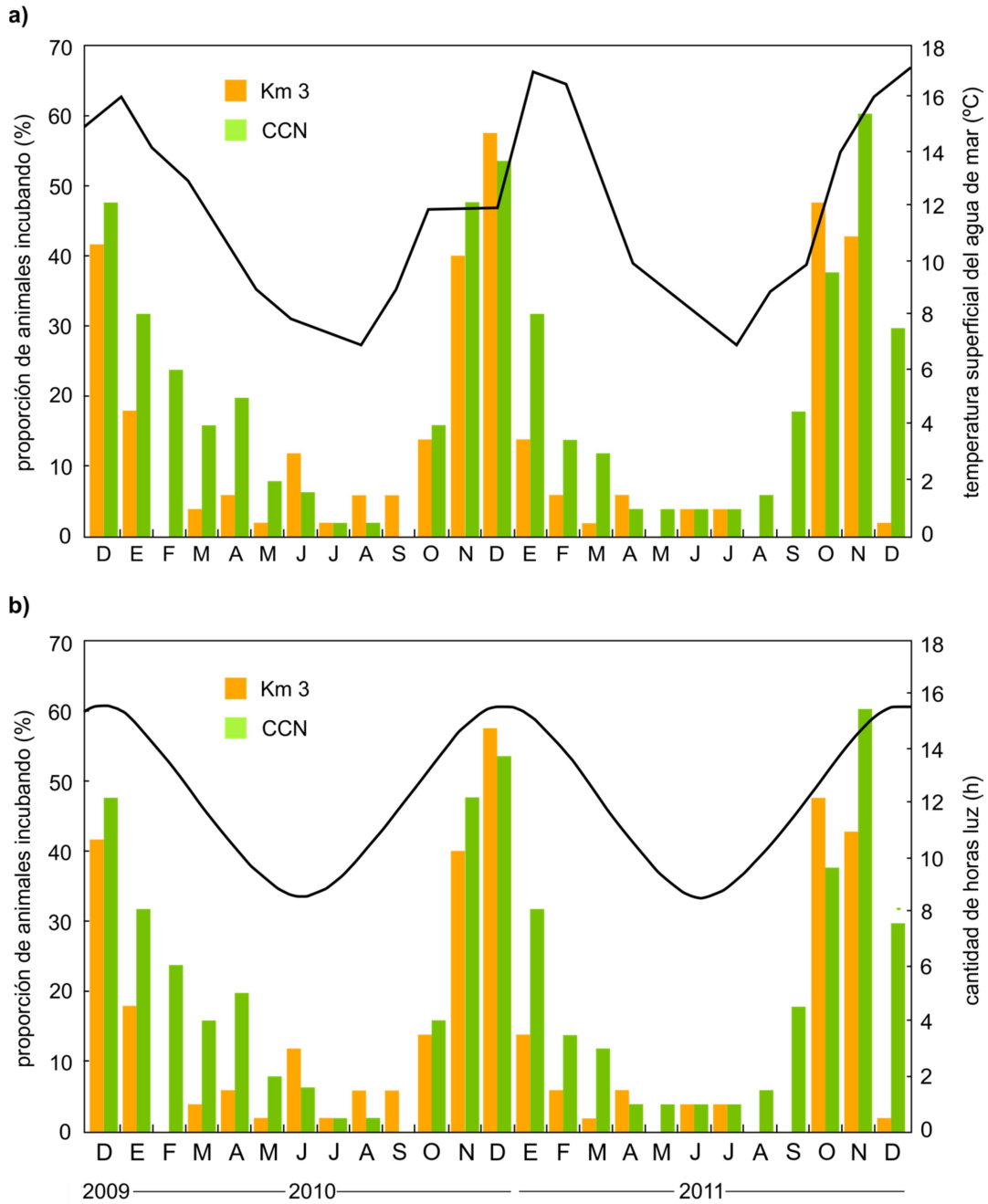


Figura 33. Proporção de animais incubando para as duas localidades entre dezembro de 2009 e dezembro de 2011. a) relação com a temperatura superficial do mar; b) relação com a quantidade de horas de luz.

Fecundidad

Relación entre la talla del adulto y el número de embriones

El número de huevos/embriones totales para CCN varió entre 3 y 29 (\bar{x} = 14,12 \pm 4,84; n=198), en tanto que en Km 3 la variación fue entre 3 y 37 huevos/embriones por animal (\bar{x} = 13,78 \pm 5,70; n=113). El resultado de la regresión lineal indica una relación alométrica negativa entre la talla del adulto y el número de embriones iniciales en la cámara suprabranquial para CCN ($b < 3$); Km 3 por su parte, si bien presenta un valor de pendiente $b < 3$, el valor si se encuentra contenido dentro de los límites de confianza calculados, indicando entonces una relación isométrica (Tabla 4). La relación entre el número de embriones incubando y la talla del adulto, se muestra en la figura 34.

Tabla 4. Análisis de regresión entre la talla (T) y el número de huevos/embriones en estadio inicial

Variable dep (y)	n	Log(y) = log a + b (log x)	p	r ² aj	LC 95%	
					inf.	sup.
Nº huevos/embriones iniciales						
CCN	198	Log (NºE) = 1,34 + 1,66 (logT)	<0,0001	0,373	1,36	1,96
Km 3	113	Log (NºE) = 0,21 + 2,68 (logT)	<0,0001	0,372	2,04	3,33

a = ordenada al origen; b = pendiente, n = número de individuos adultos, r²aj = coeficiente de determinación ajustado, p (H0: b = 0), LC = intervalos de confianza de b (95 %).

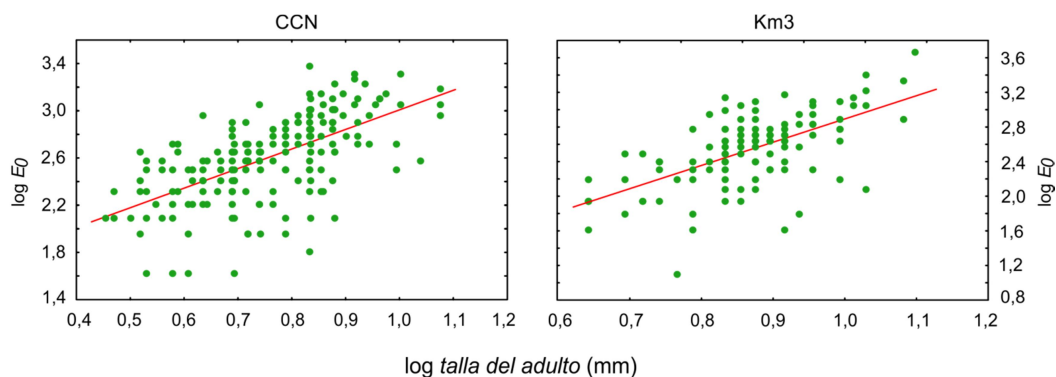


Figura 34. Relación entre la talla del adulto y el número de huevos/embriones en estadio inicial para las dos localidades. log Ein: logaritmo del número de E0.

Mortalidad de embriones

El análisis de covarianza factorial respecto al número de embriones en función de la localidad y el grado de desarrollo embrionario (iniciales: E0+E1 vs finales: E3+E4), muestra diferencias significativas sólo entre las dos localidades consideradas (CCN y Km 3) (Tabla 5). Los ejemplares analizados para Km 3 muestran números de embriones mayores que los de CCN. Dentro de cada localidad, no se observan una disminución en el número de embriones entre estadios iniciales vs. finales (Fig. 35).

Tabla 5. ANCOVA factorial. Efectos de la localidad y el periodo (o etapa) de incubación (inicial-final) sobre la fecundidad; el efecto de la talla fue incluido en el modelo como covariable.

Efecto	SC	gl	MS	F	p
Talla	4388,51	1	4388,51	228,60	<0,0001
Localidad	710,901	1	710,91	37,03	<0,0001
Estadios	1,03	1	1,03	0,05	0,82
Localidad*Estadio	3,58	1	3,58	0,19	0,67
Error	5605,59	292	19,20		

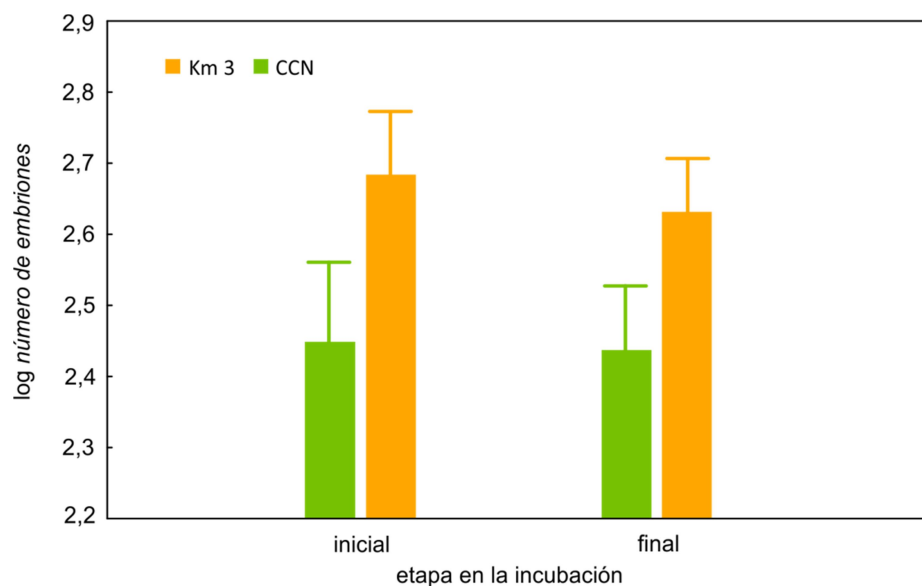


Figura 35. Variación en el número de embriones entre periodos de incubación iniciales y finales para las dos localidades (CCN y Km 3).

Variación temporal de los estadios embrionarios

Con excepción de unos pocos casos, los embriones o estadios larvales de una misma cohorte dentro de la cámara suprabranquial se encuentran en un mismo estadio de desarrollo. Si se observan embriones de distinto grado de desarrollo entre individuos, para la misma época del año. Los resultados obtenidos a partir de las pruebas exactas de χ^2 de Pearson con permutaciones de Monte Carlo, indican diferencias altamente significativas en la variación mensual de los distintos estadios embrionarios durante los dos años de muestreo, en ambas localidades ($p < 0,0001$).

En CCN, los embriones en estadio inicial se observan en mayor porcentaje durante los meses de primavera – inicio del verano. Para el año 2011 se encontró un segundo incremento en el porcentaje de animales incubando embriones en estadio inicial, durante el mes de marzo; esta situación, no se registró durante el año anterior. Los embriones en estadio de desarrollo avanzado (E3 y E4) más próximos a liberarse como juveniles, aparecen durante todo el año, los dos años de muestreo a excepción de los meses de setiembre y octubre de 2010); los máximos valores registrados para estos estadios, se observan en primavera – inicio del verano (diciembre de 2010 y noviembre de 2011), antes del máximo de temperatura del agua de mar y coincidente con el máximo en cantidad de horas luz disponible (Fig. 36).

En Km 3, la distribución general de los distintos estadios de desarrollo embrionario, es más irregular que la observada en CCN. Si bien se registraron embriones en estadio inicial en las distintas épocas del año, los mayores porcentajes se detectaron durante los meses de primavera (noviembre de 2010 y octubre de 2011). La incubación de embriones en estadios finales (E3 y E4) se observaron en su máximo porcentaje durante los meses de diciembre de 2010 y noviembre de 2011 (Fig. 36).

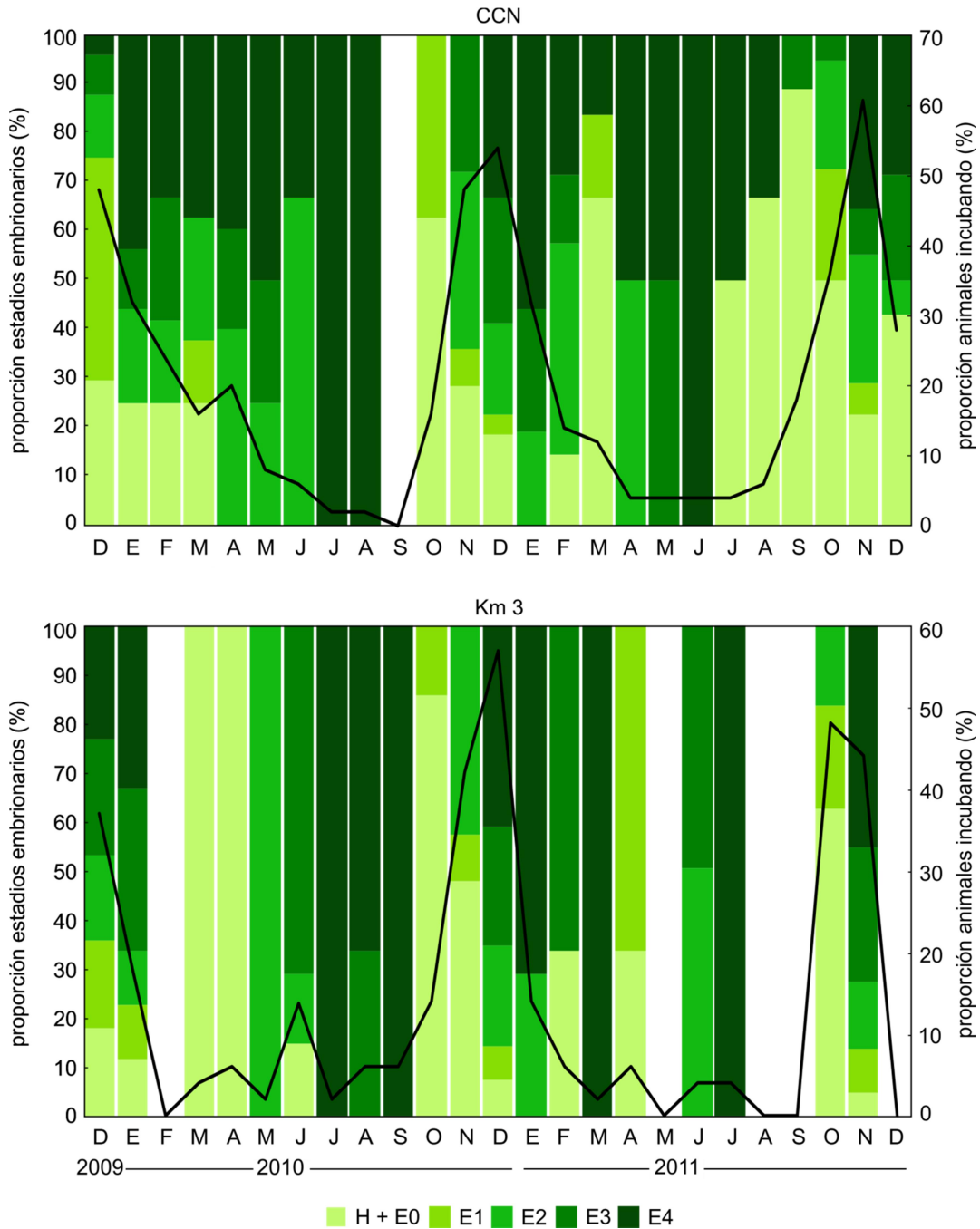


Figura 36. Variación temporal de los distintos estadios embrionarios durante el periodo de diciembre de 2009 a diciembre de 2011 para las dos localidades (CCN y Km 3).

DISCUSIÓN

El cuidado parental considerado como una especialización por Oldfield (1963) es una característica común entre los galeomátidos (Dias-Passos y Domaneschi 2009).

La población patagónica de *Lasaea* considerada en este trabajo no es la excepción e incuban sus crías en la cámara suprabranquial hasta liberarlas al medio como juveniles. Las observaciones registradas aquí resultan similares a las encontradas por algunos autores sobre la reproducción en otras especies de *Lasaea* (Oldfield 1963; Booth 1979; Beauchamp 1986; Ó Foighil 1986, 1988; Ó Foighil y Thiriou-Quévieux 1999; Altnöder y Haszprunar 2008).

En general, la información sobre el desarrollo de huevos y embriones en etapa de segmentación en las distintas especies de *Lasaea* es escasa. Oldfield (1963) se refiere al tema considerando que *L. rubra* incuba poca cantidad de huevos de gran tamaño (300 μm de diámetro). La misma autora considera el desarrollo de embriones en esta especie notoriamente modificado debido a la gran cantidad de vitelo y a la supresión del estado libre en las larvas trocófora y velíger; la segmentación en *L. rubra* resultó característica de bivalvos eulamelibranquios, holoblástica y en espiral, con el núcleo ubicado en el borde distal de cada blastómero y el citoplasma cargado de vitelo. En su trabajo, Oldfield (1963) reportó blástulas con diámetros entre 293 μm y 360 μm . Los resultados encontrados en ejemplares patagónicos no difieren de lo expuesto para *L. rubra*. En tal sentido, se encontraron embriones en distintas etapas de división, con segmentación espiral y completa; los núcleos en cada blastómero se pueden observar en una posición lateral. El diámetro medio de cada huevo o embrión (310 μm) se mantuvo constante durante todo el proceso de segmentación, indicando un aumento en la cantidad de células, sin crecimiento general del tamaño.

Oldfield (1963) menciona como característica en el desarrollo de bivalvos, una conchilla embrionaria univalva como primera estructura. En sus observaciones, la autora describe en *Lasaea* una situación completamente distinta, donde se observa desde el inicio una conchilla con dos valvas unidas por una charnela recta. Descripciones semejantes fueron reportadas para *L.*

subviridis por Beauchamp (1986), Ó Foighil (1986) y Altnöder y Haszprunar (2008). En todos los casos, los autores coinciden al afirmar que el desarrollo de la valva aparece como dos placas unidas por una charnela al final de la gastrulación en la parte dorsal, con un periostraco arrugado y el embrión carente por completo de un velo ciliado. En los ejemplares provenientes de CCN y Km 3, el desarrollo es similar al encontrado para *L. adansoni* y *L. subviridis*. En un estadio de desarrollo temprano de la valva, se puede apreciar una estructura muy delgada, de aspecto arrugado y brillante, sin coloración, ubicada en la parte dorsal del embrión.

A medida que avanza el desarrollo, Oldfield (1963) describe en *L. rubra* un aumento en la longitud (400 μm) de una valva, que adquiere forma oval y una disminución en el volumen del tejido en diferenciación al disminuir la cantidad de vitelo hasta llegar a una larva completamente desarrollada. Al igual que en las primeras etapas de desarrollo, los estadios avanzados tampoco resultaron diferentes entre los ejemplares patagónicos y las descripciones realizadas para *L. rubra* (Oldfield 1963) y *L. subviridis* (Beauchamp 1986; Ó Foighil 1986; Altnöder y Haszprunar 2008). En los animales aquí estudiados, desde el estadio 3 (E3) se aprecia una disminución considerable del tejido en diferenciación en proporción a la longitud de la valva. Ya en el estadio 4 (E4), además de continuar con el crecimiento de la conchilla (550 μm), el desarrollo es prácticamente completo; es posible diferenciar por transparencia estructuras branquiales y digestivas, terminando de formar estructuras de la charnela una vez liberados al medio.

De acuerdo a Oldfield (1963), cuando los individuos jóvenes (600 μm) son liberados por los adultos, los principales órganos y sistemas -como musculatura, tubo digestivo, sistema nervioso y órganos de los sentidos, pie y sistema pericárdico- se encuentran ya formados; a medida que el animal aumenta su talla, se van adicionando filamentos branquiales. Ya en la etapa de vida libre, se completa el desarrollo de la glándula bisal, de los palpos labiales y el tubo digestivo; se extiende el sifón inhalante y se diferencian los ligamentos internos y externos y se ubican los estatocistos; comienza la formación rudimentaria el tejido gonadal. En la etapa de incubación, los ejemplares tienen

una valva frágil, incolora y transparente, adquiriendo la coloración típica una vez alcanzado el tamaño adulto (Oldfield 1963). A excepción de *L. australis*, que tiene un desarrollo con larvas planctotróficas que son liberadas como velígeres al agua (Ó Foighil y Eernisse 1988; Ó Foighil 1989) los embriones de las especies estudiadas de *Lasaea* presentan un desarrollo semejante (Oldfield 1955, 1963; Booth 1979; Beauchamp 1986; Ó Foighil 1986; Iwasaki 1996; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999; Altnöder y Haszprunar 2008). Los resultados obtenidos en la población patagónica analizada no es la excepción; los juveniles próximos a ser liberados, presentan un desarrollo completo con una valva desarrollada, de coloración que se torna más intensa y que comienza a engrosarse cuando se encuentra fuera del adulto.

No se encontraron en otras especies de *Lasaea* referencias sobre la talla de primera incubación. La única información sobre madurez sexual fue dada a conocer por Oldfield (1963) al indicar que encuentra un desarrollo gonadal maduro en tallas desde 1,1 mm de largo. En las observaciones llevadas a cabo en ejemplares patagónicos, se pudo apreciar en CCN una talla de primera incubación estimada menor (1,72 mm) respecto de Km 3 (2,1 mm); la talla media para animales incubando también fue mayor en esta localidad. Tal diferencia en los tamaños podría estar relacionada con condiciones microambientales de cada sitio.

La incubación de larvas parece ser una estrategia bastante común y exitosa, donde las condiciones ambientales -como temperatura del agua de mar y períodos de disponibilidad de alimento, entre otras- juegan un rol importante e imponen restricciones sobre la disponibilidad energética en todas las etapas de desarrollo (Higgs *et al.* 2009).

Las variaciones poblacionales en el género *Lasaea* han sido reportadas en varias ocasiones. En algunos casos, las referencias se basan exclusivamente en la estructura de las poblaciones y adaptaciones fisiológicas en respuesta a factores y comunidad asociada (Morton 1954, 1956, 1960; Ballantine y Morton 1956; Morton *et al.* 1957; Seed y O'Connor 1980; Crisp y Standen 1988). Otros autores consideran que las diferencias en las condiciones ambientales entre las distintas etapas del desarrollo pueden crear

una fuerte presión selectiva para un determinado rasgo (Havenhand 1995). La incubación de crías como estrategia reproductiva puede ser asociada también a factores de estrés ambiental (Chaparro *et al.* 2011).

En *Lasaea rubra* de las costas de Inglaterra y del sur de Irlanda, se observó un período de incubación en los meses de primavera-verano con algunas variaciones locales (Oldfield 1963; Mc Grath y Ó Foighil 1986). Iwasaki (1996) encuentra para *L. undulata* en costas japonesas los mayores porcentajes de almejas incubando en los meses de primavera-verano, disminuyendo en otoño-invierno con dos picos intermedios a finales de invierno y de primavera. En las costas de California, *L. subviridis* pareciera tener un patrón reproductivo diferente. Al respecto, Beauchamp (1986) encuentra animales incubando durante todo el año con pequeños picos durante fines de otoño-principios de invierno y a principios del verano sin que se evidencie un ciclo reproductivo estacional.

En el caso de *Lasaea* en la costa patagónica, si bien nuestros resultados muestran animales incubando durante todo el año, se puede observar un patrón estacional en la incubación de embriones. El análisis por separado de embriones en estadio inicial y final, indica que en el primer caso, los máximos de embriones en estadio inicial se encuentran a fines de primavera-comienzo de verano en las dos localidades, en tanto que los estadios finales próximos a la emisión (E4), se observan entre uno y dos meses desfasados de los iniciales, también para ambos sitios de muestreo. Un segundo pico en la incubación de embriones, de menor intensidad e irregular en el tiempo, se observa durante comienzos de otoño con un crecimiento más lento hasta llegar al estadio de juvenil próximo a ser liberado en los meses de invierno. Asimismo, los resultados obtenidos permiten ver una relación positiva entre la cantidad de horas de luz y la talla del adulto, mientras que la localidad considerada y la temperatura superficial del agua de mar afectan de manera negativa; esto permite inferir que en general, el máximo de embriones se encuentra antes de las máximas temperaturas del agua de mar. Los resultados observados en las costas patagónicas para las dos localidades muestran un patrón en la reproducción semejante. Las diferencias que pudiera haber

respecto de otras especies de *Lasaea*, podrían ser producto de las condiciones locales en cada población, coincidente con lo propuesto por Beauchamp (1986).

En las especies incubadoras, la fecundación interna incrementa el éxito de la fertilización y el cuidado parental, con un alto costo energético, aumenta la tasa de supervivencia. La fecundidad en especies incubadoras puede ser cuantificada fácilmente y en forma precisa por conteo directo de los embriones dentro de las estructuras incubadoras del adulto (Ramírez-Llodra 2002). Entre las estrategias comunes, es posible encontrar especies que producen un pequeño número de huevos grandes y especies que, por el contrario, emiten una gran cantidad de huevos de pequeño tamaño (Ramírez-Llodra 2002). El tamaño intermedio de huevos, según algunos autores, sería selectivamente desventajoso si se considera la inversión energética de los adultos respecto de la supervivencia de las larvas (Havenhand 1995). La hipótesis propuesta por Strathmann y Strathmann (1982) sugiere que animales grandes pueden producir más cantidad de embriones de los que son capaces de incubar; de esta manera, el área disponible para cría sería un factor condicionante para el número de embriones por animal. La relación entre el área disponible aumenta en forma exponencial como una función cuadrática del largo del adulto. El peso o volumen de ciertas estructuras (como pueden ser las gónadas) manifiestan un incremento cúbico; el rendimiento reproductivo (fecundidad) suele ser directamente proporcional al volumen de las gónadas (Kabat 1985).

Dentro del orden Veneroidea es común encontrar especies k-estrategas, con incubación y cierto cuidado parental de sus crías, con fecundidad y mortalidades bajas como ocurre, por ejemplo, en *Sphaerium* (Zumoff 1973); *Transennella* (Kabat 1985); *Corbicula* (Korniushin y Glaubrecht 2003); *Neolepton* (Zelaya e Ituarte 2004; Morton 2015); *Pisidium* (Korniushin y Glaubrecht 2006); *Adacnarca* (Higgs *et al.* 2009); *Gaimardia* (Chaparro *et al.* 2011); *Lissarca* (Reed *et al.* 2013). Los trabajos llevados a cabo sobre el género, indican una estrategia reproductiva semejante a la mencionada para algunos veneroideos. *Lasaea subviridis* en la costa de California (Beauchamp 1986), *L. rubra* en Gran Bretaña (Mc Grath y Ó Foighil 1986) y *L. undulata* en la

costa japonesa (Iwasaki 1996) presentan una relación positiva entre el tamaño del adulto y el número de embriones. Sin embargo, esta relación fue diferente en cada una de ellas; *L. subviridis* y *L. rubra* tienen un número medio de embriones entre 10 y 20, con un rango que varía entre 1 y 30 considerando todos los estadios (Beauchamp 1986; Mc Grath y Ó Foighil 1986), mientras que en *L. undulata* y *L. colmani* el rango de embriones en la cámara suprabranquial fue claramente superior, encontrándose entre 1 y 133 crías (Iwasaki 1996) en el primer caso y 9 a 145 en el segundo (Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999).

En *Lasaea* de las costas del golfo San Jorge, el número de embriones dentro de las branquias osciló entre 3 y 29 en CCN y entre 3 y 37 en Km 3. La relación entre la talla y el número de embriones es isométrica para Km3, en tanto que resultó alométrica negativa para CCN con un número de embriones menor al que potencialmente podrían incubar, dando sustento a la hipótesis Strathmann (1982). El análisis por separado en el número de embriones para las dos localidades, indica diferencias entre localidades pero no entre individuos de la misma localidad. Este resultado sugiere que la inversión reproductiva (fecundidad) es diferente entre las localidades estudiadas; sin embargo, en ambos sitios no resulta significativa la variación entre el número de embriones iniciales y finales, dando idea de una pérdida de embriones por mortalidad muy baja. Algunos trabajos consideran que la fecundidad inicial, tendría relación con la disponibilidad de alimento que haya tenido el adulto durante su propio desarrollo, condicionando su capacidad reproductiva (Beekey & Hornbach 2004). La diferencia encontrada entre CCN y Km 3, para la relación talla del adulto – número de embriones incubando con un mayor número de embriones en Km 3, podría estar indicando una menor disponibilidad de alimento en detrimento de los adultos de CCN, y en consecuencia, de una menor fecundidad que en Km 3.

La variación temporal de los distintos estadios larvales en el género *Lasaea* tampoco ha sido analizada en detalle. Oldfield (1963) menciona en su trabajo sobre reproducción que las larvas de *Lasaea rubra* son incubadas por un período determinado de dos meses, con una alimentación lecitotrófica o endotrófica hasta ser liberados como juveniles; la autora considera que el largo

periodo que permanecen dentro de las branquias podría ser una adaptación, especialmente al estrés ambiental ocasionado por las condiciones variables de sequedad y variaciones térmicas entre la marea alta y marea baja. Mc Grath y Ó Foighil (1986) afirman que *L. rubra* presenta un patrón de incubación sincrónico, con embriones de una misma cohorte en igual estadio de desarrollo dentro de la cámara suprabranquial.

En nuestro trabajo se analizó la variación mensual de los distintos estadios embrionarios para las dos localidades del golfo San Jorge. Los resultados indican un patrón similar al encontrado en las costas británicas; en ejemplares patagónicos de *Lasaea* se pudieron identificar distintos estadios de desarrollo durante todo el año. El lapso de tiempo transcurrido entre los picos máximos de embriones iniciales y finales, coincide con el tiempo total de desarrollo dentro de las branquias desde el estadio de huevo sin segmentación hasta la formación de juveniles propuesto por Oldfield (1963). Las observaciones realizadas en animales de las dos localidades consideradas, permiten concluir que no hay una variación significativa en el grado de desarrollo de embriones de una misma cohorte. Este resultado supone una sincronía en el desarrollo embrionario dentro de cada adulto.

Beauchamp (1986) sugiere que el modo de desarrollo de *Lasaea* reduce el riesgo de mortalidad y permite a los reclutas colonizar el hábitat inmediatamente cercano a donde fueron liberados como juveniles. Los resultados encontrados en ejemplares patagónicos, indican una liberación máxima de juveniles al medio externo hacia principios de verano, evento que podría estar relacionado con la mayor disponibilidad de alimento (Fernández 2006).

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV

NÚMERO CROMOSÓMICO DE *LASAEA* EN LA COSTA PATAGÓNICA

INTRODUCCIÓN

Inicialmente, los estudios citogenéticos en bivalvos se limitaban a determinar el número de cromosomas en especies de interés comercial (Li y Havenhand 1997; Molleda *et al.* 1999; Cross *et al.* 2002; Thiriot-Quévieux 2002). A partir de las últimas décadas, se comenzaron a utilizar nuevas técnicas de bandeo y comparaciones en las longitudes totales y de los brazos cromosómicos que permitieron el análisis de cariotipos a nivel intra- e interespecíficos (Molleda *et al.* 1999; Cross *et al.* 2002). En general, las técnicas citogenéticas incluyen diferentes niveles de detalle, desde los análisis morfológicos hasta los moleculares, dependiendo del objetivo y la tecnología a aplicar (Thiriot-Quévieux 2002). En algunas especies se han encontrado cariotipos estables, en tanto que en otras se han registrado variaciones en número y estructura cromosómica intra- e interpoblacionales (Gallardo 2011). Las variaciones interespecíficas pueden ser interpretadas mediante distintas técnicas de tinción diferencial (bandedos cromosómicos) y análisis de la morfología y número cromosómico (Li y Havenhand 1997; Cross *et al.* 2002). Dentro de las técnicas de bandeo, los métodos de tinción con plata localizan las regiones con actividad nucleolar en determinados cromosomas (Cross *et al.* 2002). Esta técnica detecta en interfase un organizador nucleolar (NORs) por cada copia de ADN antes de la duplicación, en tanto que en metafase se verán sólo las regiones nucleolares que han sido activadas en la interfase anterior. De esta manera, la diferencia en el número de NOR activos representa las regiones cromosómicas que contienen múltiples copias de los genes de ADN_r (Cross *et al.* 2002; Leitão y Chaves 2008).

El análisis de poliploidía ha sido estudiado en varios casos para evaluar las variaciones intra- e interespecíficas (Thiriot-Quiévreux 2002). La poliploidía ha sido ampliamente descrita en plantas, pero resulta menos frecuente en animales (Jara-Seguel *et al.* 2010; Gallardo 2011; Hallinan y Lindberg 2011). Algunos autores sugieren que la poliploidía en animales podría estar más limitada a causa de la determinación sexual cromosómica; el proceso de poliploidización podría involucrar eventos de hibridación o autoploidía. En consecuencia, animales poliploides presentan comúnmente formas reproductivas de tipo partenogénicas apomícticas (Stenberg y Saura 2009). En forma natural, se han reportado varias especies de moluscos bivalvos poliploides, con un elevado número de cromosomas y variaciones en el nivel de ploidía, incluso dentro del mismo género (Thiriot-Quiévreux 2002). Otra de las alteraciones en el cariotipo diploide normal puede deberse a la presencia de cromosomas B (cromosomas supernumerarios, también llamados “cromosomas parásitos”). Se ha sugerido que estos cromosomas son producto de un periodo de inestabilidad genotípica debido a procesos reproductivos de tipo endogámicos (Evans 1960). Entre los moluscos, se han encontrado cromosomas B en algunos gasterópodos y en bivalvos del orden Veneroida en los géneros *Lasaea* (Thiriot-Quiévreux *et al.* 1988), *Cerastoderma* (Insua y Thiriot-Quiévreux 1992) y *Sphaerium* (Petkevičiūtė *et al.* 2007; Kořínková y Král 2011).

Estudios citogenéticos llevados a cabo en bivalvos de diferentes familias, han mostrado diferencias significativas en el número de cromosomas. En algunos trabajos de revisión, se cita en general para las especies del orden Veneroida un complemento cromosómico $2n = 24-48$, con $2n = 38$ como número más común (Nakamura 1985; Lee 1999; Thiriot-Quiévreux 2002) y variaciones en algunas familias (Skuzza *et al.* 2009). En particular, para el género *Lasaea*, el complemento cromosómico ha sido estudiado en varias poblaciones (Fig. 37) y resulta especialmente interesante debido a la variabilidad en número y estructura que presentan (Thiriot-Quiévreux *et al.* 1988).

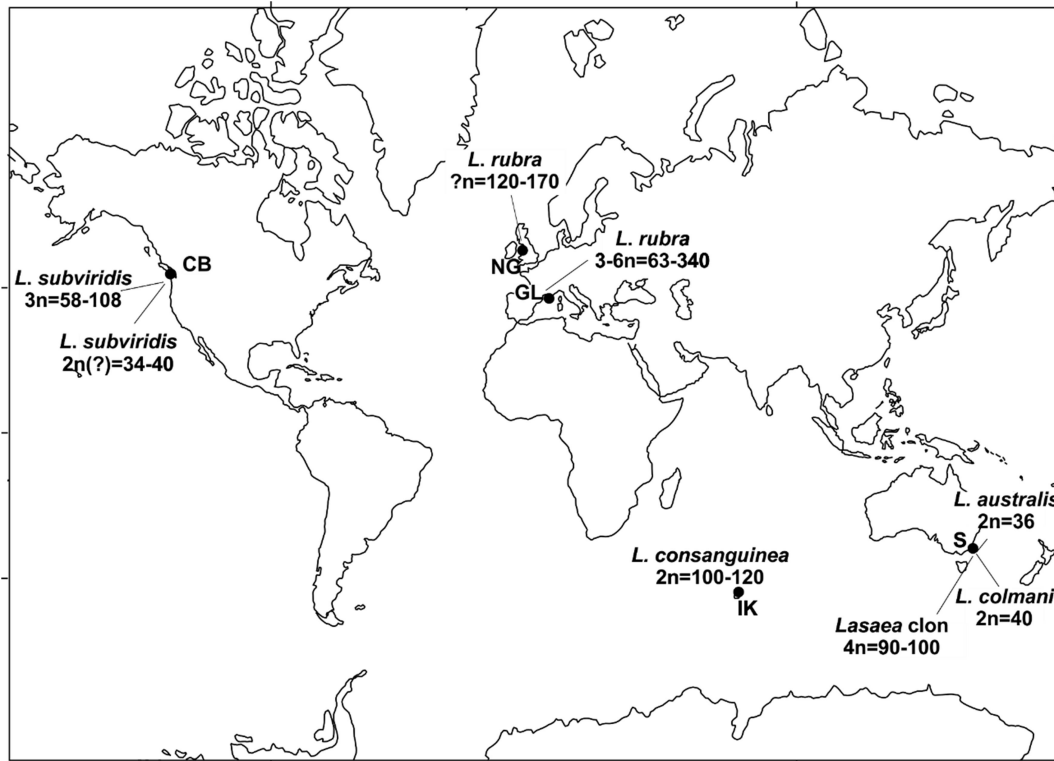


Figura 37. Complemento cromosómico reportado para varias poblaciones del género *Lasaea*. CB: Columbia Británica (Pacífico Este); GL: Golfo de Lion (Mar Mediterráneo); IK: Islas Kerguelen (Océano Índico); NG: Norte de Gales; S: Sidney (Pacífico Oeste). Mapa elaborado a partir de la información procedente de la bibliografía citada en este capítulo sobre número cromosómico en diversas especies de *Lasaea*.

Varios autores (Thiriot-Quévieux *et al.* 1988, 1989; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1991, 1999; Thiriot-Quévieux 1992) han sugerido, además, que los distintos niveles de ploidía y la presencia de cromosomas supernumerarios, serían los responsables de un mecanismo reproductivo del tipo apomítico, sin obtención de gametos por meiosis y sin fusión de pronúcleos.

Finalmente, a efectos de lograr establecer una diferenciación genética entre poblaciones del género *Lasaea*, en algunos trabajos se hace referencia al nivel de polimorfismo y heterocigosidad mediante el uso de marcadores moleculares basados en isoenzimas (Crisp y Standen 1988; Tyler-Walters y Crisp 1989; Tyler-Walters y Davenport 1990; Taylor y Ó Foighil 2000) y ADN (RAPDs) (Tyler-Walters y Hawkins 1995). Estos autores coinciden en sus resultados al indicar una escasa variabilidad en las poblaciones analizadas, con

frecuencias alélicas fijas en cada población. La falta de polimorfismo podría estar relacionada con un mecanismo reproductivo del tipo apomítico, donde no existiría variabilidad producida por entrecruzamiento. En este contexto, se describe al género *Lasaea* como un complejo de clones (Ó Foighil y Smith 1995).

El objetivo general de este capítulo es conocer el complemento cromosómico de *Lasaea* en la costa patagónica a partir de: (1) analizar la cariología de *Lasaea* en distintas localidades de la costa patagónica; (2) confeccionar el cariotipo mediante las metafases obtenidas; (3) analizar el número de organizadores nucleolares (NORs) presentes en células en interfase; (4) comparar los resultados con los obtenidos por otros autores para distintas especies de *Lasaea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Observación de cromosomas

Para evaluar el número cromosómico en los ejemplares patagónicos, se probaron las técnicas descritas por Lee (1999), Park *et al.* (2000) y Jara-Seguel *et al.* (2005) para tres especies de venéridos; por Pan *et al.* (2004) en un bivalvo comercial del género *Chlamys* y para el género *Lasaea* por Thiriot-Quévieux (1992), las cuales se describen en la Tabla 6. Tras evaluar los resultados, se modificó la técnica descrita por Thiriot-Quévieux (1992) optimizando algunos parámetros como: (1) concentración y tiempo de la solución inhibidora de la mitosis (colchicina); (2) tipo, concentración y tiempo de solución hipotónica; (3) temperatura del portaobjetos al momento de colocar la suspensión celular (frío, temperatura ambiente, calor) y (4) tipo de colorante empleado en la tinción hasta obtener resultados óptimos. En base a todas las combinaciones llevadas a cabo, los mejores resultados para la obtención de metafases consistieron en: (1) someter los ejemplares vivos y recién recolectados a un tratamiento de colchicina 0,05 % (dilución en agua de mar), durante 12 horas en heladera con temperatura controlada semejante al agua

de mar al momento de la toma de muestras; (2) romper ligeramente las valvas de cada individuo antes de iniciar el tratamiento, a efectos de garantizar el contacto con las soluciones de trabajo; (3) colocar los individuos en una solución hipotónica de KCl 0,075 M durante 1,5 horas a temperatura ambiente y (4) fijarlos en Carnoy frío (solución 3:1 metanol-ácido acético conservada a -18 °C); con dos cambios de 20 minutos cada uno y un tercer cambio como conservante. Las muestras se dejaron no menos de 24 horas en *freezer* (temperatura -18 °C) hasta el momento de realizar los preparados.

Para la observación de metafases: (1) se seccionaron bajo microscopio estereoscópico los animales pretratados y conservados en *freezer*; separándose el tejido a utilizar (branquias, gónadas, embriones o juveniles y tejidos remanentes). El aparato digestivo fue descartado (incluido sus divertículos) ya que podría contener células de otros organismos; (2) se mantuvieron los tejidos en una solución de ácido acético 50 % durante 10-15 minutos hasta lograr una suspensión celular; (3) para la obtención de preparados, se colocó una gota de suspensión celular en portaobjetos previamente calentados a 60 °C y se los dejó secar al aire; (4) se realizó una tinción con Giemsa 4 % durante 10 minutos; (5) se enjuagaron los preparados con agua destilada para evitar el precipitado del colorante sobre los vidrios, se los dejó secar nuevamente y (6) se los montó con bálsamo de Canadá sintético para una mejor conservación hasta su observación al microscopio.

Para la elaboración del cariotipo se utilizó material de Punta Cuevas (Golfo Nuevo). Como se describe más abajo, se realizaron mediciones sobre los cromosomas en metafase utilizando el programa Image J y a partir de las fotografías tomadas con microscopio óptico, se tomó el largo total (LT) y la longitud de los brazos largos (BL) y brazos cortos (BC). La morfología (relación de brazos e índice centromérico) y clasificación de los cromosomas (metacéntrico, submetacéntrico, subtlocéntrico y telocéntrico) se realizó según lo propuesto por Levan *et al.* (1964):

$$\text{Índice centromérico: } IC = \frac{BC}{LT} \quad \text{Relación de brazos: } RB = \frac{BL}{BC}$$

Tabla 6. Técnicas para obtener metafases puestas a prueba. Las técnicas numeradas del 1 al 5 corresponden a modificaciones propias en las concentraciones y tiempos de exposición. La técnica 5 (en negrita) mostró los mejores resultados y fue seleccionada para observar las metafases.

Técnica	Colchicina	Solución hipotónica	Fijación	Tinción	Preparado
Thiriot-Quévieux (1992) para <i>Lasaea</i>	0,005 % por 9 a 12 hs (individuos enteros)	citrato Na 0,9 % 45'	etanol-acético (3:1) 3 baños de 20' c/u	Giemsa 4% por 20'	goteo y secado al aire
Park <i>et al.</i> (2000) para <i>Corbicula</i>	0,05 % por 20 a 24 hs (tejido gonadal)	NaCl 0,01 % 10'	etanol-acético (3:1) 3 baños de 20' c/u	Giemsa 4 % por 10'	<i>squash</i>
Lee (1999) para <i>Sphaerium</i>	0,005 % por 1,5 hs (inyectado en tejido gonadal)	agua destilada 40 a 60'	etanol-acético (3:1) 3 baños de 20' c/u	Orceína acética	<i>squash</i>
Jara-Seguel <i>et al.</i> (2005) para <i>Musculium</i>	0,05 % por 2 hs (individuos enteros)	agua corriente (1:1 v/v) 45'	etanol-acético (3:1) 1 baño de 24 hs	reacción de Feulgen	<i>squash</i>
Pan <i>et al.</i> (2004) para <i>Chlamys</i>	0,1 % por 2 hs (individuos enteros)	KCl 0,075 M 30'	etanol-acético (3:1) frío 3 baños de 20' c/u	Giemsa 10 % por 30'	goteo y secado al aire
Técnica 1	0,005 % por 20 hs (individuos enteros)	KCl 0,075 M 60'	etanol-acético (3:1) frío 3 baños de 20' c/u	Giemsa 10 % por 30'	goteo y secado al aire
Técnica 2	0,05 % por 4 hs (individuos enteros)	citrato Na 0,9% 45-60'	etanol-acético (3:1) frío 3 baños de 20' c/u	Giemsa 10 % por 30'	goteo y secado al aire
Técnica 3	0,5 % por 2 hs (individuos enteros)	KCl 0,075 M 60'	etanol-acético (3:1) frío 3 baños de 20' c/u	Giemsa 10 % por 30'	goteo y secado al aire
Técnica 4	0,5 % por 1 h (individuos enteros)	KCl 0,075 M 60'	etanol-acético (3:1) frío 3 baños de 20' c/u	Giemsa 10 % por 30'	goteo y secado al aire
Técnica 5: modificaciones adoptadas	0,05 % por 12 hs a T° controlada (individuos enteros)	KCl 0,075 M 1 ½ hs	metanol-acético (3:1) frío 3 baños de 20' c/u	Giemsa 4 % por 10'	goteo en vidrio a 60 °C y secado al aire

Entre las distintas técnicas de tinción probadas, y con el fin de lograr una mejor definición de la región centromérica en la observación de metafases, se realizó una prueba de bandeo C. Para ello se utilizó la técnica original descrita por Sumner (1972) para cromosomas humanos; se probó también la modificación a la técnica propuesta por Martínez-Lage *et al.* (1994) para el género *Mytilus* (Tabla 7). La técnica se descartó por lograrse mejores resultados con la tinción tradicional con Giemsa.

Observación de regiones de organizadores nucleolares (Bandas NORs)

La tinción con plata (Ag-NORs) permite localizar las regiones de organizadores nucleolares en cromosomas metafásicos. Esta técnica tiñe exclusivamente los organizadores nucleolares (NORs) y de esta manera representan regiones cromosómicas que contienen genes de ADNr (Cross *et al.* 2002; Leitão y Chaves 2008). Para la observación de las regiones de organizadores nucleolares (NORs), se siguió la técnica descrita por Felip *et al.* (2009). Una vez obtenidos los preparados a partir de la suspensión celular descrita previamente, se realizó una tinción con nitrato de plata. Para ello se enjuagaron previamente los preparados con una solución diluida de ácido fórmico (una gota de ácido fórmico puro en 200 ml de agua destilada) y se dejaron secar. Para la tinción, se colocaron sobre el portaobjetos dos gotas de la solución estabilizadora (2 g de gelatina disuelta en 100 ml de agua destilada con 1 ml de ácido fórmico) y cuatro gotas de solución acuosa de nitrato de plata (disolución de NO_3Ag en agua destilada en proporción 1:2). Se colocó un cubreobjetos sobre cada preparado para generar una cámara de humedad y se los incubó por 2 minutos a 60 °C. Se removió el cubreobjetos con agua destilada y se dejaron secar los vidrios hasta su observación bajo microscopio.

Tabla 7. Técnicas de bandeado C probadas en ejemplares patagónicos de *Lasaea*.

Técnica	H Cl	(OH) ₂ Ba	2xSSC (0,3 M NaCl + 0,03 tri Citr Na)	Tinción
Sumner (1972)	0,2 N por 1 h T° amb	5 % por 10-15' 60 °C	1 h a 60 °C	Giemsa 2 %
Martínez-Lage (1994)	1 N por 5' T° amb	5 % por 5' 60 °C	15' a 60 °C	Naranja de acridina 0,01 % en Sörensen (0,06M pH 6,5) 5'

En todos los casos, las fotografías de las metafases fueron tomadas a 1.000 aumentos con una cámara digital OLYMPUS U-TVO 5X-C3 conectada a un microscopio OLYMPUS BX-51 y las mediciones de cromosomas se realizaron con el programa para análisis de imágenes de uso libre ImageJ 1.42q (Abràmoff *et al.* 2004).

Análisis estadísticos

Para establecer la existencia de diferencias en el número de cromosomas entre las localidades consideradas, se llevó a cabo un análisis de la varianza para n desiguales, con transformación de raíz cuadrada. La homogeneidad de varianzas se analizó mediante una prueba de Levene.

Para el conteo de NORs se consideró el valor de la mediana y la desviación absoluta de la misma.

Los análisis se efectuaron mediante el uso del paquete estadístico Statistica 7.

RESULTADOS

Complemento cromosómico

El conteo de cromosomas en metafase (122 metafases en total) obtenidos a partir de individuos de los distintos puntos de muestreo considerados, se indica en la Tabla 8. Para el número cromosómico en las cuatro localidades consideradas, no se encontraron diferencias significativas en

la homogeneidad de varianzas ($p>0,5$) (Tabla 9); el análisis de la varianza no mostró diferencias significativas en el número de cromosomas metafásicos para cada localidad ($p>0,5$) (Tabla 10).

Tabla 8. Número cromosómico encontrado en ejemplares patagónicos de *Lasaea* en las localidades consideradas.

Localidad	Nº metafases mitóticas	Nº cromosomas (mediana)	Rango
Pto. del Hambre (Chile)	n =6	48±4	42-52
Belvedere	n =15	47±1	43-55
Km 3	n =63	48±2	42-52
Pta. Cuevas	n =38	48±2	43-54

Tabla 9. Análisis de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) para el número cromosómico metafásico de *Lasaea* entre localidades consideradas.

	Efecto CM	Error CM	F	p
Raíz Nº cromosómico	0,0302	0,0199	1,5177	0,2182

Tabla 10. ANOVA para el número cromosómico metafásico de *Lasaea* en las localidades patagónicas transformados al valor de raíz cuadrada.

	SC	gl	CM	F	p
Localidad	0,306	3	0,102	1,54	0,2122
Error	4,308	65	0,066		

Las mediciones de longitud total (LT), índice centromérico (IC) y relación de brazos (RB) de los cromosomas se realizaron sobre una metafase con $2n=$ de 48+6 cromosomas (Figs. 38 y 39). El apareamiento entre homólogos, según la clasificación de Levan *et al.* (1964) en base al índice centromérico (IC) dio como resultado tres pares de cromosomas metacéntricos, cinco submetacéntricos, diez subtlocéntricos, seis telocéntricos y seis cromosomas sin aparear (un metacéntrico y cinco telocéntricos) (Tabla 11). En la Figura 40 se puede observar el idiograma obtenido a partir de las longitudes medias de cada par.

Tabla 11. Morfología de los cromosomas de *Lasaea* de costas patagónicas según clasificación de Levan (1964). Longitud total (LT), índice centromérico (IC) y relación de brazos (RB) \bar{x} : media del par homólogo; DE: desvío estándar. M: metacéntrico; sm: submetacéntrico; st: subtelocéntrico; t: telocéntrico; B: cromosoma B.

Par	LT		IC		RB		Tipo
	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	
1	5,66	0,14	44,63	2,49	1,24	0,19	M
2	2,09	0,02	40,24	1,75	1,42	0,15	M
3	1,98	0,11	43,74	8,89	1,29	0,60	M
4	3,77	0,10	32,11	6,69	1,94	0,85	sm
5	3,45	0,21	28,57	1,33	2,50	0,27	sm
6	2,88	0,12	36,28	5,08	1,78	0,39	sm
7	2,64	0,15	29,55	0,59	2,30	0,11	sm
8	1,60	0,03	37,09	7,26	1,78	0,40	sm
9	3,34	0,04	21,43	2,20	3,75	0,08	st
10	3,31	0,18	13,44	2,66	6,34	1,00	st
11	2,88	0,02	17,63	3,29	4,79	0,83	st
12	2,85	0,07	20,97	1,46	3,78	0,33	st
13	2,84	0,02	23,81	3,16	3,21	0,53	st
14	2,73	0,03	20,57	1,69	3,83	0,47	st
15	2,57	0,02	15,11	1,12	5,37	0,05	st
16	1,77	0,31	17,63	1,42	5,37	0,05	st
17	1,55	0,01	15,47	2,60	4,71	1,35	st
18	1,18	0,09	20,30	6,97	4,44	1,37	st
19	2,22	0,08	12,32	1,56	7,57	1,46	t
20	2,22	0,08	3,10	1,57	34,40	16,30	t
21	1,99	0,10	9,68	0,47	9,17	1,69	t
22	1,36	0,02	8,20	2,70	11,42	3,86	t
23	0,87	0,02	9,84	0,21	10,01	0,43	t
24	0,86	0,04	7,13	0,34	12,20	0,21	t
25	1,56	-----	40,09	-----	16,77	-----	M (B)
26	1,06	-----	12,12	-----	1,26	-----	t (B)
27	0,95	-----	6,40	-----	14,52	-----	t (B)
28	0,90	-----	10,73	-----	9,40	-----	t (B)
29	0,90	-----	9,50	-----	7,29	-----	t (B)
30	0,79	-----	5,42	-----	8,56	-----	t (B)

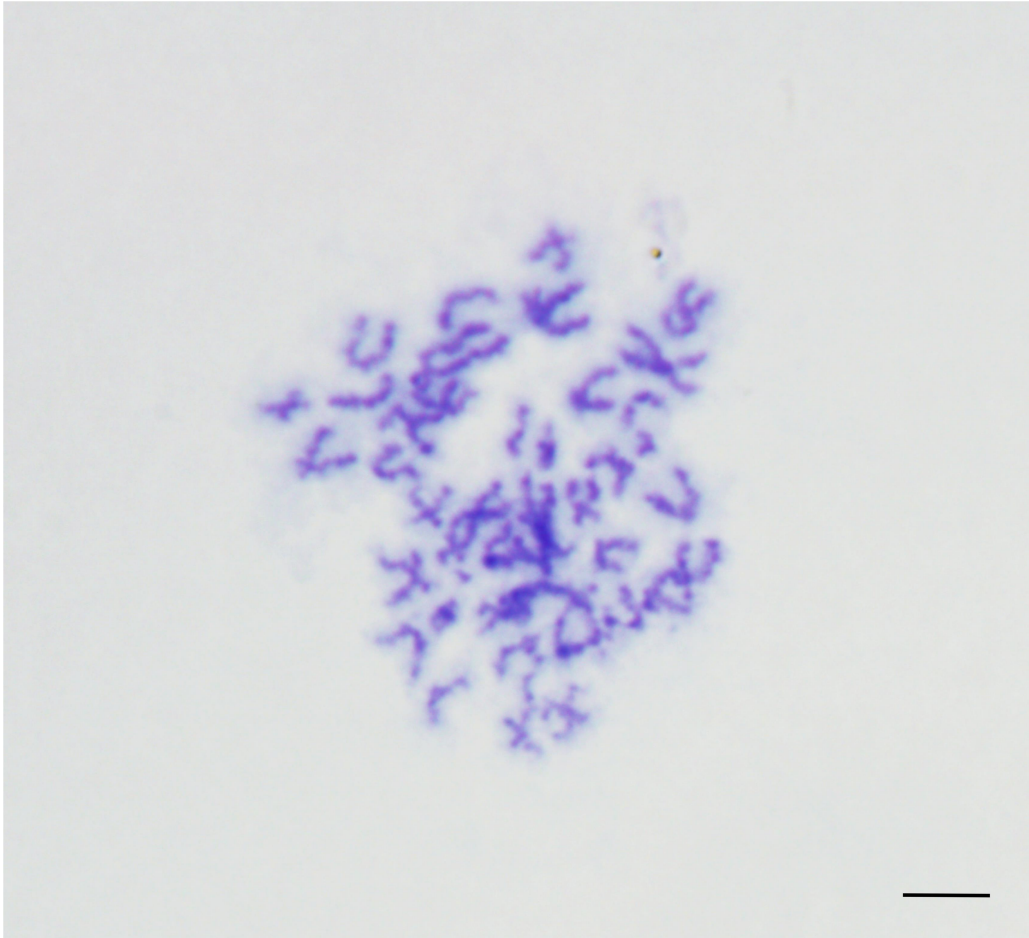


Figura 38. Metafase mitótica de *Lasaea* (Pta. Cuevas). Escala 5 μm .

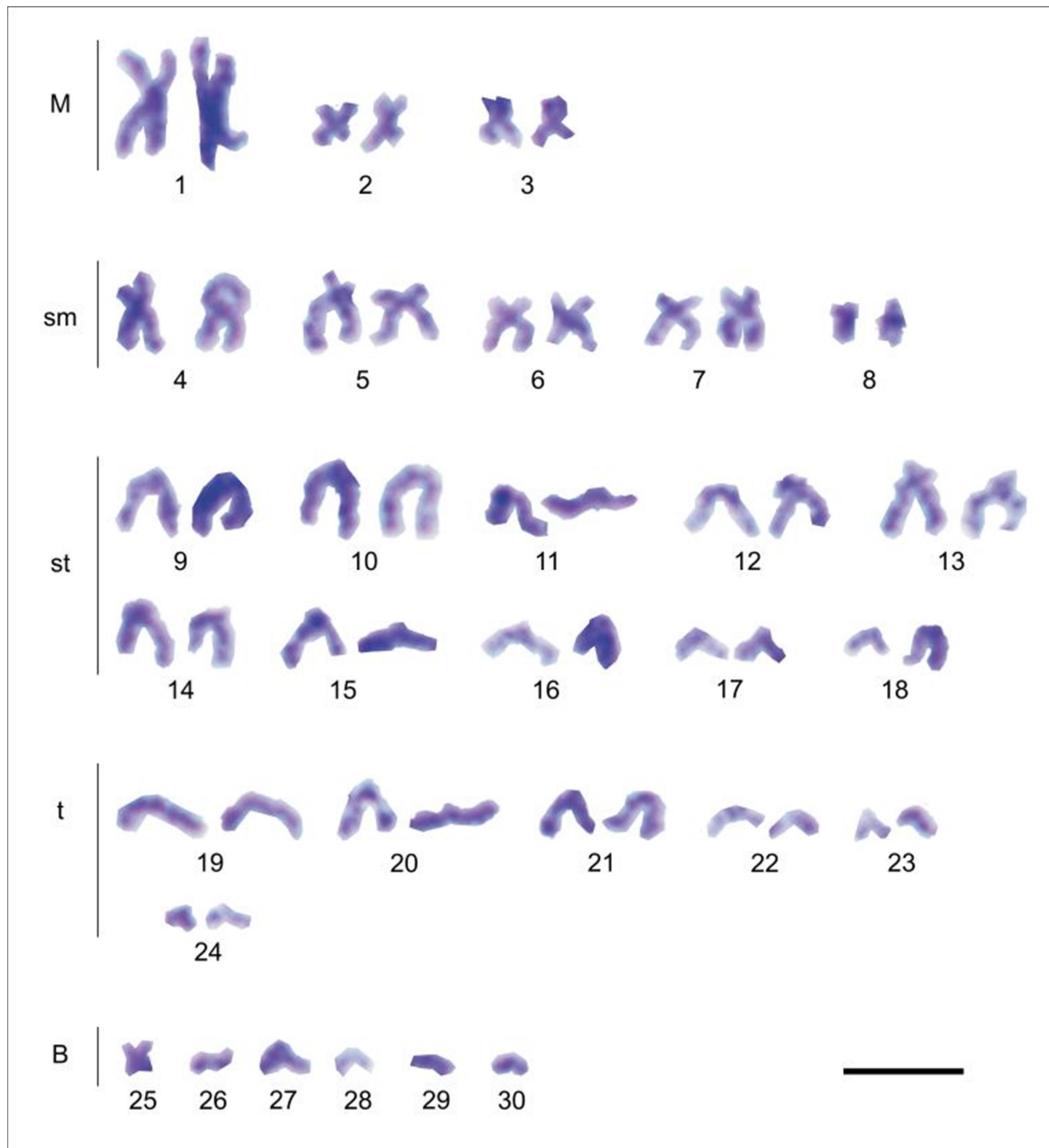


Figura 39. Cariotipo obtenido a partir de la medición de cromosomas. M: metacéntrico; sm: submetacéntrico; st: subteloicéntrico; t: telocéntrico; B: cromosoma B. Escala 5 μm .

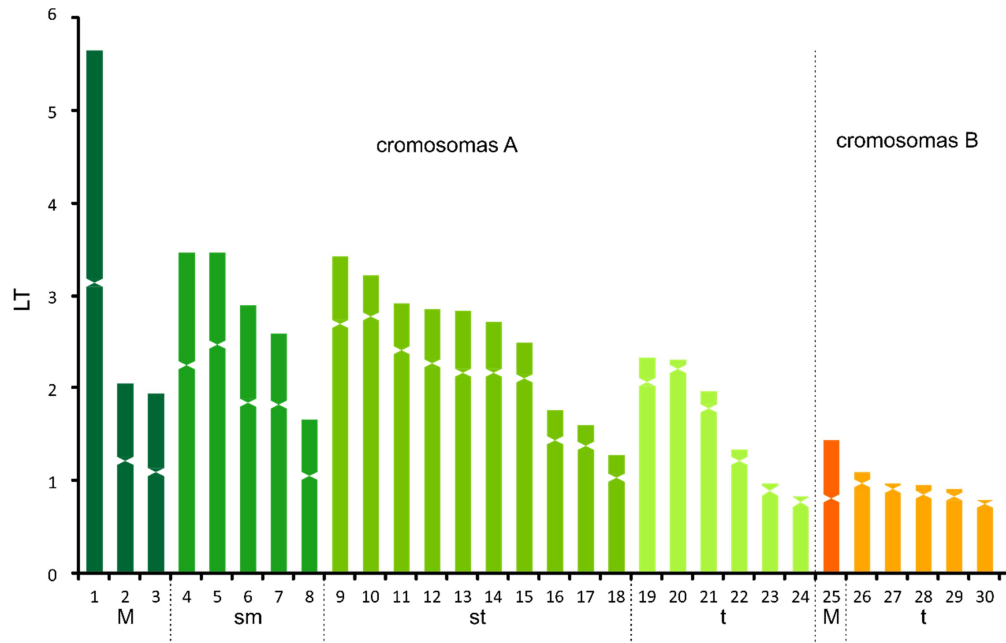


Figura 40. Idiograma obtenido a partir de las mediciones de homólogos apareados. M: metacéntrico; sm: submetacéntrico; st: subtelocéntrico; t: telocéntrico.

NORs

La técnica para visualizar regiones de organizadores nucleolares (NORs) se aplicó en 109 células de individuos de la localidad de Km 3 (Golfo San Jorge). En la Figura 41 se observan células en interfase con las regiones nucleolares teñidas con nitrato de plata. Los conteos mostraron un valor de mediana = 2 ± 1 ($n = 109$) con una variación entre uno y tres NORs por célula.

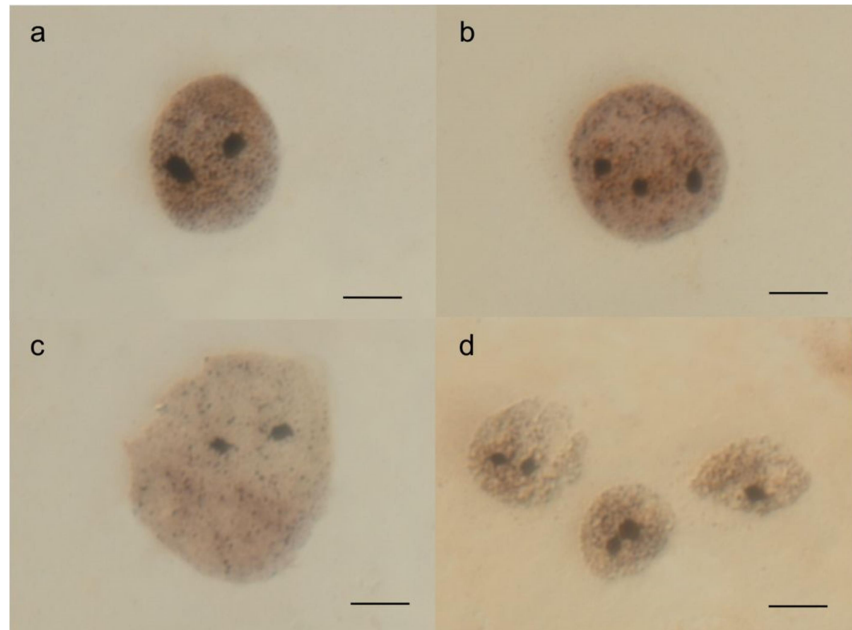


Figura 41. Organizadores nucleolares (NOR) obtenidos mediante la técnica de tinción con plata: (a) célula con dos NORs; (b) célula con tres NORs; (c) célula con dos NORs y (d) dos células con dos NORs y una célula con un NOR. Escalas 10 μ m.

DISCUSIÓN

El cariotipo y contenido de ADN son características particularmente importantes al momento de definir la estructura genética de una especie y su potencial cambio evolutivo (Cavalier-Smith 1985; Martínez-Lage e Insua 1997).

Dentro de los veneroideos en general, se han encontrado en varios casos una variabilidad importante en el número cromosómico, tanto en organismos marinos como de agua dulce. En general, las variaciones en el contenido de ADN y la morfología cromosómica pueden deberse a eventos del tipo aneuploides (pérdida o duplicación de algunos cromosomas aislados), poliploides (aumento del complemento cromosómico entero por euploidías) ó presencia de cromosomas supernumerarios (número variable de cromosomas B) (Thiriot-Quévieux 2002).

El uso de diferentes técnicas de laboratorio de medición de los cromosomas y análisis estadísticos, ha permitido detectar con mayor definición estas diferencias intra- e interespecíficas referidas al contenido de ADN (Insua *et al.* 1994; Ladrón de Guevara *et al.* 1996; Leitão *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1999; Thiriot-Quévieux 2002).

Varios trabajos sugieren que las diferencias en número y ubicaciones de las regiones de organizadores nucleolares dentro de los cromosomas, permiten hacer inferencias filogenéticas entre especies; pudiendo considerarse tales regiones como indicadores de caracteres plesiomórficos (Thiriot-Quévieux 2002; Leitão y Chaves 2008). Los análisis llevados a cabo en varias especies de bivalvos, indican en cada caso al menos una pareja de cromosomas con genes ribosomales, aunque puede haber más de estos genes en otras parejas de homólogos (Martínez-Expósito *et al.* 1994; Cross *et al.* 2002). La información sobre el análisis en número de NOR es variada; se ha encontrado que el número máximo varía de una especie a otra incluso dentro del mismo género y que no existiría relación alguna entre el número de NOR y la dotación cromosómica de la especie en cuestión (Martínez-Lage e Insua 1997). Un aspecto común entre los bivalvos, pareciera ser el heteromorfismo encontrado intra- e interindividuos en el número de organizadores nucleolares por célula y que ha sido interpretado como una variación funcional más que estructural (Martínez-Lage e Insua 1997). En algunos casos, los nucléolos pueden fusionarse y, en consecuencia, verse uno solo en interfase independientemente de la cantidad de pares cromosómicos con actividad NOR (Martínez-Expósito *et al.* 1994; Cross *et al.* 2002). Otros autores consideran que, como la tinción Ag-NOR se refiere a las interfases precedentes antes de la duplicación del ADN, el conteo en el número máximo de NOR en una especie tiene cierta relación con el nivel de ploidía. En consecuencia, el conteo de organizadores nucleolares ha sido propuesto como un método indirecto para verificar el nivel de ploidía y es ampliamente utilizado para el análisis de triploides en peces (Carman *et al.* 1992; Felip *et al.* 2009).

Se ha indicado, además, que los cromosomas B pueden tener algún efecto sobre la expresión de ciertos genes que codifican para la actividad

ribosomal de los cromosomas A y, en consecuencia, podrían provocar una mayor frecuencia en la expresión de las regiones organizadoras nucleolares (NORs) (Kirk y Jones 1970; Camacho 1997; Camacho *et al.* 2000). Los cromosomas B no resultan esenciales para el organismo y pueden variar en número entre células de un mismo individuo, entre individuos de una población y entre poblaciones. Estos cromosomas no sufren recombinación con el resto del complemento estándar (cromosomas A), muestran un mecanismo de segregación no-mendeliano, se caracterizan por el alto contenido de heterocromatina, su pequeño tamaño en metafase y están constituidos generalmente por genes inactivos (Camacho 1997; Camacho *et al.* 2000; Kořínková y Král 2011).

Los resultados citogenéticos obtenidos para el género *Lasaea* resultan particularmente interesantes. Se han citado distintos niveles de ploidía para las distintas especies, con complementos cromosómicos que varían en forma y tamaño en cada caso. En tal sentido, se han registrado hasta el momento sólo dos especies simpátridas con número de cromosomas diploide y reproducción sexual, ambas con una distribución limitada a la costa australiana: *Lasaea australis* ($2n = 36$) (Thiriot-Quévieux 1992) y *L. colmani* ($2n = 40$) (Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999). Para el resto de las especies analizadas, los complementos cromosómicos resultan poliploides, sin metafases meióticas y con presencia de cromosomas B o supernumerarios en cantidades variables: poblaciones poliploides australianas ($4n = 90-100$) (Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1999). Según Tyler-Walters y Crisp (1989), *L. rubra* en las costas del norte de Gales presenta un complemento cromosómico poliploide de 120-170 cromosomas en tanto que, de acuerdo a las evidencias presentadas por Thiriot-Quévieux *et al.* (1989) para la costa occidental del Mediterráneo, *L. rubra* presenta valores cromosómicos poliploides muy variables ($3-6n = 63-340$). Para *L. subviridis* del Pacífico noreste la información es contradictoria; en su trabajo sobre evidencias citológicas de autofertilización, Ó Foighil (1987) menciona una meiosis con 34-40 cromátidas en el primer cuerpo polar y 16-20 cromátidas para el segundo cuerpo polar, valores acordes para venéridos diploides ($2n = 34-40$). Por su parte, Ó Foighil y Thiriot-Quévieux (1991) indican un

complemento cromosómico superior para la misma especie ($3n = 90-100$). *Lasaea consanguinea* de las islas Kerguelen constituye un caso particular, dado que muestra un cariotipo diploide pero con importante cantidad de cromosomas supernumerarios ($2n = 100-120$) y reproducción asexual (Thiriot-Quévieux *et al.* 1988). Los resultados sobre el número de cromosomas obtenido en las cuatro localidades de la costa patagónica se encuentran dentro del rango propuesto por varios autores (Thiriot-Quévieux 2002; Skuza *et al.* 2009) para venéridos diploides: 24 pares de cromosomas y seis cromosomas sin aparear (cromosomas B). El conteo de regiones de organizadores nucleolares (NOR) por célula en ejemplares patagónicos, mostró un resultado (mediana = 2 ± 1) consistente con lo esperado según la bibliografía para un complemento cromosómico diploide.

El modo exacto de reproducción en el género *Lasaea* ha generado grandes controversias. A excepción de las dos especies australianas (*L. australis* y *L. colmani*) que son diploides y con reproducción sexual (Ó Foighil 1988; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux. 1999), el resto de las poblaciones han sido descritas por algunos autores como hermafroditas autofecundantes (Beauchamp 1986; Mc Grath y Ó Foighil 1986; Ó Foighil 1987) en tanto que otros consideran que se trata de poblaciones apomícticas (Crisp y Standen 1988; Tyler-Walters y Crisp 1989; Tyler-Walters y Davenport 1990; Tyler-Walters y Hawkins 1995). Por su parte, Thiriot-Quévieux *et al.* (1988) sugieren que el elevado número cromosómico en *L. consanguinea* podría tener relación con una inestabilidad genética ancestral producto de la presencia de cromosomas supernumerarios, causando alteraciones en el normal desarrollo de la división meiótica. Asumiendo que las poblaciones poliploides de *Lasaea* son clones con reproducción partenogénica, algunos trabajos presentan evidencia basada en datos obtenidos a partir del análisis de alozimas (Crisp y Standen 1988; Taylor y Ó Foighil 2000) y un trabajo referido al análisis de polimorfismo mediante el uso de marcadores moleculares por amplificación aleatoria del ADN (RAPD) (Tyler-Walters y Hawkins 1995). Ó Foighil (1987) propone para *L. subviridis* un mecanismo reproductivo del tipo autofecundación, con valores altos de homocigosis. Por su parte, Crisp y

Standen (1988) encontraron tres clones de *L. rubra* diferenciados según la altura de marea, con valores de heterocigosis elevados en cada caso. Taylor y Ó Foighil (2000) reportaron desviaciones de las frecuencias esperadas para apareamientos aleatorios según Hardy-Weinberg (fijación de heterocigotos) en poblaciones de Japón, Nueva Zelanda, sur de África, Florida y Bermuda, avalando un mecanismo reproductivo apomíctico.

Las definiciones sobre la partenogénesis y su significado también presentan diferencias entre los diversos autores. Algunos consideran a la partenogénesis como un mecanismo de reproducción asexual, con diferencias en las modalidades de ocurrencia. Así, la apomixis implica la supresión por completo de la división meiótica y los huevos se desarrollan sin fertilización con un número cromosómico igual a las células somáticas; la automixis, por su parte, conserva la meiosis sin que ocurra una fertilización entre gametos femeninos y masculinos, en cuyo caso el ovocito haploide se fusiona con un cuerpo polar restituyendo el número cromosómico. Finalmente, se puede observar un mecanismo denominado ginogénesis o seudogamia, en el cual los gametos masculinos inducen el desarrollo del huevo sin contribuir a la dotación cromosómica final (Tomlinson 1966; Lynch 1984; Beaukeboom y Vrijenhoek 1998; Simon *et al.* 2003; Lanteri *et al.* 2010; Wilson y Sherman 2010). Por su parte, Boyden (1950, 1954) sugiere que la partenogénesis es un tipo de reproducción sexual con producción de gametos y sin fusión de pronúcleos. El autor restringe el término de reproducción asexual a un mecanismo de reproducción vegetativo por brote o fisión binaria.

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

La sistemática de moluscos se ha basado, de modo tradicional, en la morfología de sus valvas. *Lasaea* conforma un género taxonómicamente complejo de bivalvos intermareales con una distribución cosmopolita (Ó Foighil y Eernisse 1988).

Keen (1938) lista más de cuarenta especies de *Lasaea*, distinguiendo unas de otras por la morfología y coloración de la conchilla, en tanto que Ponder (1971) considera que se trata de ecotipos de *L. rubra*. De acuerdo a la base de datos WoRMS, hay aceptadas veintitres especies dentro del género *Lasaea*, entre las que se encuentra una especie fósil (Bouchet 2018).

En base a estudios de genética de poblaciones y filogenéticos, algunos autores concluyen que, a excepción de dos especies australianas con reproducción sexual (*L. australis* y *L. colmani*), el resto de las poblaciones de *Lasaea* presentan mecanismos reproductivos asexuales (Crisp *et al.* 1983; Crisp y Standen 1988; Thiriot-Quévieux 1988; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1991, 1999; Ó Foighil y Smith 1995, 1996; Ó Foighil y Jozefowicz 1999) y, en consecuencia, se trata de un complejo de clones sin distinción nominal (Ó Foighil y Smith 1995, 1996).

En función de las descripciones originales y la observación de ejemplares recolectados en distintas localidades del Mar Argentino y Estrecho de Magallanes, se puede decir que *Lasaea* de la costa patagónica presenta variaciones en la forma y coloración de sus valvas, probablemente como consecuencia de las variaciones locales en el hábitat, como pueden ser parámetros físico-químicos y exposición al oleaje; sin embargo, teniendo en cuenta la morfología de la charnela, se puede afirmar que se trata en todos los casos de la misma especie, correspondiendo llamarla *Lasaea miliaris* (Philippi, 1845) con localidad tipo en Bahía El Águila (53° 47' S; 70° 59' O; Estrecho de

Magallanes, Chile); siendo ésta, la localidad tipo para una especie de *Lasaea* más cercana a las consideradas en este trabajo.

Consideraciones sobre la reproducción de *Lasaea miliaris*

El género *Lasaea* presenta características reproductivas poco comunes dentro de los bivalvos. La mayoría presenta un desarrollo de sus embriones en la cámara suprabranquial hasta ser liberados en estadio de juveniles (Popham 1940; Oldfield 1955, 1963; Beauchamp 1986; Ó Foighil 1989; Altnöder y Haszprunar 2008), con excepción de *L. australis* que emite sus larvas al plancton como velíger (Ó Foighil 1988). En los ejemplares patagónicos analizados, se pudo corroborar que se trata también de una especie hermafrodita que incuba sus embriones. Como adaptación al cuidado de sus crías, *L. miliaris* presenta una estructura eulamelibranquia modificada, acorde a las necesidades de retener sus embriones en la branquias. Estas características anatómicas de reducción de hemibranquias, fusiones interfilamentares elásticas, uniones a la masa visceral y el manto y abundante cantidad de cilios, son coincidentes con las reportadas por distintos autores para otras especies incubadoras dentro del género *Lasaea* (Oldfield 1955) y del orden Veneroida en general (Graf y Ó Foighil 2000; Korniuschin 2002; Dias-Passos y Domaneschi 2009).

Los representantes de la superfamilia Galeommatoidea se han descrito principalmente como hermafroditas protándricos, protogínicos ó simultáneos, donde la gónada se desarrolla como un ovotestis (Oldfield 1955; Popham 1979; Beauchamp 1986; Ó Foighil 1987, 1989; Jespersen y Lützen 2006; Fox *et al.* 2007; Petersen y Lützen 2008; Zelaya e Ituarte 2012). En algunas especies hermafroditas simultáneas se ha sugerido que, como una estrategia ventajosa en la asignación de recursos, la fracción masculina del ovotestis se halla considerablemente reducida respecto del tejido ovárico (Beauchamp 1986; Eckelbarger *et al.* 1990; Jespersen y Lützen 2006, Petersen y Lützen 2008). En trabajos llevados a cabo en poblaciones de *L. rubra* y *L. subviridis*, se encontró que el tejido testicular ocupa aproximadamente 10 % del total de la gónada con una escasa producción de espermatozoides (Ó Foighil 1985, 1988; Beauchamp

1986; Mc Grath y Ó Foighil 1986; Ó Foighil y Eernisse 1988). Por el contrario, *L. australis*, que posee un mecanismo reproductivo sexual con fecundación cruzada, el tejido testicular representa casi 50 % del ovotestis (Ó Foighil 1988). A partir de cortes histológicos fue posible determinar que *L. miliaris*, además de desarrollar su gónada como un ovotestis, tanto el tejido ovárico como el tejido testicular tienen una maduración sincrónica. En lo que se refiere a la proporción de la gónada masculina, también se observó una fracción menor respecto del porcentaje total (aproximadamente 30 %), con una cantidad reducida de espermatozoides.

De particular interés es la morfología que presentan los espermatozoides en los ejemplares patagónicos. Los bivalvos en general, exhiben un espermatozoide primitivo (Franzén 1983) y, en particular dentro de la superfamilia Galeommatoidea, pueden tener estructuras variadas (Eckelbarger *et al.* 1990). En el género *Lasaea* se han descrito características atípicas, como son una cabeza esférica o ligeramente elipsoidal, con un flagelo simple más corto que el flagelo típico de un espermatozoide primitivo (Ó Foighil 1985; Mc Grath y Ó Foighil 1986). A partir de las observaciones de tejido gonadal fresco en material de *L. miliaris*, fue posible distinguir espermatozoides de cabeza redondeada y con un acrosoma prominente semejante a la descripción hecha para *L. subviridis* (Ó Foighil 1985; Beauchamp 1986). Sin embargo, los espermatozoides de *L. miliaris* se diferencian claramente por la presencia de dos flagelos móviles, de distinta longitud. Este tipo de espermatozoides biflagelados fue mencionado para varios taxones de invertebrados como platelmintos de vida libre y parásita, poliquetos y algunos insectos (Franzén 1982; Kitajima *et al.* 1976; Trueman 1999; Watson 1999; Dallai *et al.* 2001). Entre los moluscos, sólo fue encontrado en el género *Corbicula* (del orden Veneroidea), donde los mismos no presentan una meiosis reduccional, con un mecanismo reproductivo en el que interviene exclusivamente el genoma paterno (androgénesis) (Korniushin y Glaubrecht 2003; Korniushin 2004; Pigneur *et al.* 2012).

Crisp y Standen (1988) sugieren que los organismos hermafroditas con una reproducción del tipo ginogénesis ó pseudogamia -donde los gametos

masculinos cumplen un rol desencadenante en el desarrollo de huevos sin que se fusionen los pronúcleos con los gametos femeninos- la cantidad de espermatozoides producidos resulta escasa. Los hermafroditas que muestran pseudogamia necesitan producir sólo pequeñas cantidades de esperma ya que no tienen que superar la entrada genética competitiva de los individuos vecinos (Crisp y Sanden 1988). Se ha observado en varias especies partenogénicas la capacidad de producir gametos masculinos. Algunos autores coinciden al afirmar que puede tratarse de un efecto residual del proceso de hibridación entre especies ancestrales (Dufresne y Hebert 1994; Simon *et al.* 2010). Gran parte de los invertebrados surgidos por hibridación muestran algún grado de poliploidía (Lanteri *et al.* 2010); estas poblaciones muestran niveles altos de heterocigosidad en contraste con los linajes partenogénicos con un origen automítico espontáneo que muestran un patrón homocigota (Crisp y Standen 1988; Dufresne y Hebert 1994; Simon *et al.* 2010). La autofertilización tiende a eliminar en cada generación los genotipos heterocigotas (Crisp y Standen 1988); a su vez, la fuerte asociación entre partenogénesis y poliploidía, hace que resulte difícil medir la heterosis (Dufresne y Hebert 1994).

La información disponible sobre reproducción en las especies incubadoras de *Lasaea* resulta contradictoria. Por un lado, varios autores proponen para *L. rubra* un mecanismo reproductivo del tipo partenogénico, basados en el análisis de poblaciones mediante isoenzimas y marcadores moleculares; los resultados, coinciden en la falta de variabilidad genética, motivo por el cual se supone una reproducción asexual sin recombinación cromosómica (Crisp *et al.* 1983; Crisp y Standen 1988; Tyler-Walters y Hawkins 1995).

Las poblaciones de *Lasaea*, ampliamente distribuidas, muestran una variación en el nivel de ploidía y número cromosómico considerable (Thiriot-Quévieux *et al.* 1988, 1989; Thiriot-Quévieux 1992; Ó Foighil y Thiriot-Quévieux 1991, 1999). Thiriot-Quévieux *et al.* (1988) encuentran una variabilidad cromosómica inusual dentro de una misma población de *Lasaea consanguinea* en las Islas Kerguelen ($2n = 100-120$), con importante cantidad de cromosomas supernumerarios. Con anterioridad, Evans (1960) había

propuesto que los cromosomas supernumerarios ó "B", serían consecuencia de varios periodos de reproducción endogámica ancestral. En el caso de *L. consanguinea*, podría haber un ancestro hermafrodita autofecundante que habría conducido a la inestabilidad genética (Thiriot-Quévieux *et al.* 1988). En las localidades patagónicas donde se llevaron a cabo análisis citogenéticos, el resultado fue similar en cada caso y conforme con lo esperado para un bivalvo diploide. Los ejemplares patagónicos considerados presentan un complemento cromosómico apareado en su mayoría, con unos pocos cromosomas sin homólogos de tamaño y morfología similar a los cromosomas supernumerarios ($2n = 48+6$). El complemento cromosómico encontrado en Patagonia para el género *Lasaea* se asemeja en alguna manera a *L. consanguinea* si se considera que en ambos casos el resultado es $2n$; sin embargo, el número de cromosomas en *L. miliaris* se encuentra dentro del rango esperado para un bivalvo venérico de reproducción sexual ($2n = 38$ como número más común; Thiriot-Quévieux 2002).

Por otra parte, Ó Foighil (1987) plantea en su trabajo las evidencias citológicas encontradas en *L. subviridis*, que sustentan la teoría de la autofertilización. Este autor considera que los resultados encontrados son completamente consistentes con una autofertilización o autogamia, no así con una reproducción del tipo apomixis sin fusión de gametos femeninos y masculinos. Fundamenta sus resultados con la observación de un número cromosómico haploide en los huevos de *L. subviridis* y la presencia de dos cuerpos polares adheridos a la superficie de ellos, dando idea de una meiosis reduccional en las células gaméticas. De acuerdo a Ó Foighil (1987), los resultados encontrados por Crisp *et al.* (1983) sobre la capacidad de reproducirse en forma aislada y la formación de homocigotas, no permite distinguir entre una reproducción por autogamia de un mecanismo apomítico, siendo una característica a favor de la hipótesis de Crisp *et al.* (1983) la carencia de espermatozoides en las observaciones. Sin embargo, ésta podría deberse a una falla en la metodología, considerando la escasa cantidad y poca movilidad que estos tienen.

A pesar de ello, un trabajo posterior de Ó Foighil y Thiriot-Quévieux (1991), presenta evidencias que indican que los ejemplares de *Lasaea* del Pacífico Noreste (correspondiente a *L. subviridis*) tienen un complemento cromosómico elevado, variable y con presencia de cromosomas supernumerarios ($3n = 90-100$). Los autores no encuentran en su trabajo metafases meióticas; el núcleo del espermatozoide se desintegra en la corteza del huevo y no se produce una fusión de pronúcleos; así, los cuerpos polares encontrados presentan un número cromosómico diploide, inconsistente con una reducción meiótica. En los análisis citológicos realizados en las costas de Patagonia en ejemplares de *L. miliaris*, resulta por demás interesante la presencia de microtúbulos, que se pueden observar formando un huso acromático en aquellos ovocitos con vitelogénesis avanzada; esto permite pensar que se trata de estructuras formadas en una segunda división meiótica para continuar con la diferenciación de las células, hasta la maduración de las ovótidas.

Pese a las evidencias citológicas que puedan indicar un proceso reduccional en la formación de gametos, como pueden ser la formación del primero y segundo cuerpo polar, algunos autores encuentran mecanismos de reproducción partenogénica, con divisiones meióticas y recombinación que permiten mantener la variabilidad genética, pero donde el proceso finaliza con la fusión, en distintas etapas según cada caso, de células del mismo organismo como pueden ser los cuerpos polares, dando como producto final una nueva forma diploide sin la intervención de espermatozoides. Este proceso, variante de una partenogénesis automítica, fue citado en representantes de varios filos, aunque resulta poco común (Beaukeboom y Vrijenhoek 1998; Stenberg y Saura 2009; Lanteri *et al.* 2010; Simon *et al.* 2010). La partenogénesis dependiente de espermatozoides (ginogénesis) se asocia frecuentemente con el hermafroditismo, especialmente en platelmintos, nematodos, anélidos y moluscos. El hermafroditismo elimina la necesidad de un mecanismo de determinación sexual y la evolución asociada de los cromosomas sexuales heteromórficos, responsable de la escasa poliploidía en animales (Beaukeboom y Vrijenhoek 1998).

En lo que se refiere al desarrollo de embriones en animales incubadores, numerosos trabajos coinciden al afirmar que se trata de un mecanismo frecuente entre invertebrados de pequeño tamaño, considerando la existencia de una cierta relación entre el tamaño que pueda alcanzar el adulto y la capacidad de éste para contenerlos (Chia 1974; Strathmann y Strathmann 1982; Kabat 1985; Havenhand 1995). Asimismo, se considera que estos animales incubadores utilizan como estrategia ventajosa la producción de poca cantidad de huevos, de gran tamaño y elevada cantidad de vitelo, evitando así la masiva emisión que se da en animales planctotróficos; el cuidado parental de huevos lecitotróficos supone un mayor gasto energético y menor fecundidad, pero garantiza una mortalidad baja de sus crías (Havenhand 1995; Ramírez-Llodra 2002). La incubación es considerada por varios autores como una característica especializada dentro de los bivalvos eulamelibranquios (Oldfield 1963; Dias-Passos y Domaneschi 2009). Dentro de la superfamilia Galeommatoidea, la producción de huevos lecitotróficos e incubación de embriones hasta un estado avanzado de desarrollo se ha registrado en varios géneros (Dias-Passos y Domaneschi 2009).

En particular, dentro del género *Lasaea*, Oldfield (1963) describe en forma detallada en ejemplares de *L. rubra* la presencia de huevos grandes (>180 μm) y con gran cantidad de vitelo incubando en la cámara suprabranquial. Un desarrollo similar fue observado posteriormente en la misma especie por Altnöder y Haszprunar (2008) y por Beauchamp (1986) en *L. subviridis*. En todos los casos, los autores coinciden en que dentro de las branquias ocurre el crecimiento y diferenciación de embriones hasta formar juveniles completamente desarrollados.

La gametogénesis y la variación temporal que pueda haber en el ciclo reproductivo de los bivalvos, también ha sido tema de estudio en varias oportunidades (Ortiz-Galarza *et al.* 2011, entre otros). Dentro de los bivalvos, es común encontrar ciclos reproductivos anuales con uno o más periodos de desove y que este proceso se vincule con las condiciones ambientales del lugar (Gosling 2003; Crnčević *et al.* 2013). El género *Lasaea* no es la excepción y su ciclo reproductivo ha sido estudiado en diferentes especies. En varias

publicaciones, los resultados para *L. rubra* son coincidentes en aseverar que las poblaciones presentan una reproducción anual estacional, con dos eventos de desove al año, uno más intenso que el otro (Oldfield 1963, Seed y O'Connor 1980; Mc Grath y Ó Foighil 1986). Resultados similares fueron observados en *L. undulata* (Iwasaki 1996). En *L. subviridis*, Beauchamp (1986) reporta para ejemplares de la costa de California, un desarrollo gonadal continuo con emisión de gametos a las branquias durante todo el año, demostrando así que el ciclo reproductivo de cada especie será distinto en cada localidad, según las condiciones particulares que se presenten.

Lasaea miliaris en la costa central del Golfo San Jorge se comporta en forma semejante a lo descrito para otras especies dentro del género. Produce poca cantidad de huevos grandes, con gran cantidad de vitelo. El ciclo gonadal es estacional con un pico de desove principal durante los meses de verano, seguidos de una recuperación en los meses de otoño e invierno. Los resultados obtenidos en nuestras costas permiten inferir una sincronía en la emisión de gametos femeninos y masculinos; la maduración de la gónada en general se da luego de un periodo reproductivo (primavera – verano) con recuperación hacia los meses de otoño – invierno, coincidente con la disminución de la temperatura del agua de mar.

Si bien el desarrollo de los embriones dentro de la cámara suprabranquial en *L. miliaris* se observó durante todo el año, los mayores porcentajes se registraron durante los meses de primavera – verano, sugiriendo una reproducción estacional. Los valores máximos de embriones en estadio final se encuentran desplazados entre uno y dos meses de los estadios iniciales y aproximadamente tres meses desde los máximos considerados en la emisión de gametos. Estos resultados permiten suponer una duración total del desarrollo que rondaría entre tres y cuatro meses, con la liberación de juveniles principalmente hacia mediados y fines del verano. El desarrollo de embriones y la posterior emisión de juveniles tuvieron un patrón semejante entre las localidades consideradas, con pequeñas diferencias debidas a condiciones locales.

La interpretación en su conjunto de los resultados encontrados en *Lasaea miliaris*, con evidencias de una segunda segregación meiótica durante la formación de gametos, espermatozoides biflagelados, móviles y con un prominente acrosoma en apariencia funcional, sumados a una sincronía en la maduración de gametos y un complemento cromosómico diploide típico de un bivalvo de reproducción sexual, permiten inferir para esta especie un mecanismo reproductivo del tipo autofecundante.

Trabajos futuros sobre aspectos citológicos específicos y la aplicación de técnicas moleculares adecuadas para evaluar los niveles de variabilidad en las distintas localidades, permitirán ampliar los resultados aquí planteados, discriminando entre los supuestos de una especie endogámica autofertilizante ó con reproducción partenogenética del tipo dependiente de espermatozoides.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se puede concluir que:

- ✓ De acuerdo a los caracteres morfológicos y al número cromosómico, las localidades patagónicas analizadas pertenecen a *Lasaea miliaris* (Philippi, 1845).
- ✓ La anatomía de las branquias en *Lasaea miliaris* está adaptada para el cuidado parental de los embriones, acorde con la incubación en la cámara suprabranquial.
- ✓ El espermatozoide biflagelado y de cabeza redondeada de *Lasaea miliaris* es una característica poco común dentro de los bivalvos.
- ✓ La movilidad de los espermatozoides, apoya la hipótesis de una autofecundación.
- ✓ Se encontraron evidencias citológicas que sustentan una segunda división meiótica, luego de la etapa de reducción.

- ✓ La emisión hacia las branquias de gametos de las gónadas femenina y masculina es sincrónica.
- ✓ *Lasaea miliaris* incuba poca cantidad de huevos, de gran tamaño y mucha cantidad de vitelo.
- ✓ El desarrollo larval observado en las localidades patagónicas es similar al reportado para otras especies de *Lasaea* incubadoras.
- ✓ Los ejemplares patagónicos muestran un ciclo reproductivo estacional con máximos en la liberación de juveniles durante el verano.
- ✓ Los ciclos reproductivos presentan ligeras diferencias entre las localidades consideradas, sugiriendo que el comportamiento es afectado por las condiciones ambientales del lugar.
- ✓ *Lasaea miliaris* tiene un complemento cromosómico diploide, semejante en todas los casos considerados y acorde a un bivalvo veneroideo de reproducción sexual.
- ✓ Los resultados encontrados a lo largo de este trabajo, permiten inferir que *L. miliaris* tiene un mecanismo reproductivo de autofertilización, diferente de los aceptados para la generalidad del género, a excepción de dos especies diploides australianas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Acker JG, Leptoukh G. 2007. Online analysis enhances use of NASA Earth science data. *Eos Transactions American Geophysical Union* 88: 14-17.
- Ageitos de Castellanos ZJ & y Landoni NA. 1988. Catálogo descriptivo de la malacofauna marina magallánica. La Plata: Comisión de Investigaciones Científicas.
- Ageitos de Castellanos ZJ. 1994. Los invertebrados. Tomo III: primera parte. Moluscos. Estudio Sigma, Buenos Aires. 206 p.
- Agresti A. 2007. An introduction to categorical data analysis, 2nd ed. Wiley, New York. 372 p.
- Akselman R. 1996. Estudios ecológicos en el Golfo San Jorge y adyacencias (Atlántico sudoccidental). Distribución, abundancia y variación estacional del fitoplancton en relación a factores físico-químicos y la dinámica hidrológica. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 234 p.
- Altnöder A, Haszprunar G. 2008. Larval morphology of the brooding clam *Lasaea adansonii* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Heterodonta, Galeommatoidea). *Journal of Morphology* 269: 762-774.
- Ballantine D, Morton JE. 1956. Filtering, feeding, and digestion in the lamellibranch *Lasaea rubra*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 35: 241-274.
- Bastida R, Zamponi M, Bremec C, Roux A, Genzano G, Elías R. 2007. Las comunidades bentónicas, pp. 91-125. En: Carreto J.I., Bremec C. (eds.), *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*. Tomo 5. El ecosistema marino. INIDEP, Mar del Plata.

- Beauchamp KA. 1986. Reproductive ecology of the brooding, hermaphroditic clam *Lasaea subviridis*. *Marine Biology* 93: 225-235.
- Beaukeboom LW, Vrijenhoek RC. 1998. Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. Mini-review. *Journal of Evolutionary Biology* 11: 755-782.
- Beekey MA y Hornbach DJ. 2004. The effect of size-limited brood capacity on brood size in a freshwater bivalve. *The American midland naturalist* 151: 274-285.
- Bertness MD, Crain CM, Silliman BR, Bazterrica MC, Reyna MV, Hidalgo F, Farina JK. 2006. The community structure of western Atlantic Patagonian rocky shores. *Ecological Monographs* 76: 439-460.
- Bespalaya Y, Bolotov I, Aksenova O, Kondakov A, Paltser I, Gofarov M. 2015. Reproduction of *Pisidium casertanum* (Poli, 1791) in Arctic lake. *Royal Society Open Science* 2: 140-212.
- Bieler R, Mikkelsen PM. 2006. Bivalvia – a look at the branches. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 223-235.
- Bieler R, Carter JG, Coan EV. 2010. Classification of bivalve families. En: Bouchet P, Rocroi JP (eds.) *Nomenclator of bivalve families*. *Malacologia* 52: 113-184.
- Booth JD. 1979. Common bivalve larvae from New Zealand: Leptonacea. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 13: 241-254.
- Bouchet P. 2018. WoRMS Editorial Board. 2018. World Register of Marine Species. Disponible en: <http://www.marinespecies.org>
- Boyden A. 1950. Is parthenogenesis sexual or asexual reproduction? *Nature* 166: 820-820.
- Boyden A. 1954. The significance of asexual reproduction. *Systematic Zoology* 3: 26-47.
- Brown T. 1827. *Illustrations of the conchology of Great Britain and Ireland: drawn from Nature*. WH and D. Lizars, London. 144 p, 52 lám.

- Brown T. 1833. The conchologist's textbook: embracing the arrangements of Lamarck and Linnaeus, with a glossary of technical terms. Glasgow: Fullarton and Company. London. 226 p.
- Byrne M, Phelps H, Church T, Adair V, Selvakumaraswamy P, Potts J. 2000. Reproduction and development of the freshwater clam *Corbicula australis* in southeast Australia. *Hydrobiologia* 418: 185-197.
- Cabezas E, Giménez O, Balzi P, Cerdá R, Gil DG, Marcinkevicius M, Rico A. 2007. Asociaciones del macrozoobentos del litoral rocoso en la costa central del Golfo San Jorge (Argentina). *Naturalia Patagónica* 3: 17-36.
- Camacho H. 2007. Los invertebrados fósiles. Fundación de Historia Natural Félix de Azara: Universidad Maimónides. Buenos Aires. 800 p.
- Camacho JPM. 1997. Papel de los cromosomas B en la evolución de los sistemas genéticos eucarióticos, pp. 189-207. En: Organización y evolución del genoma eucariota. Marcadores moleculares. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular (A Coruña 1996). Josefina Méndez Felpeto (coord.): A Coruña Universidade.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. 2000. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 355: 163-178.
- Carcelles AR, Williamson SI. 1951. Catálogo de los moluscos marinos de la Provincia Magallánica. *Revista del Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales, Ciencias Zoológicas Tomo II, nº 5*: 386 p.
- Carman O, Oshiro T, Takashima F. 1992. Variation in the maximum number of nucleoli in diploid and triploid common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2303-2309.
- Cavalier-Smith T. 1985. The evolution of genome size. John Wiley and Sons (eds.) 523 p.
- Chaffee C, Lindberg DR. 1986. Larval biology of early cambrian molluscs: the implications of small body size. *Bulletin of Marine Science* 39: 536-549.

- Chaparro OR, Schmidt AJ, Pardo LM, Andrade PV, Wagner CE, Cubillos VM. 2011. Reproductive strategy of the semelparous clam *Gaimardia bahamondei* (Bivalvia, Gaimardiidae). *Invertebrate Biology* 130: 49-59.
- Chaparro OR, Thompson RJ, Ward JE. 1993. *In vivo* observations of larval brooding in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* Philippi, 1845. *The Biological Bulletin* 185: 365-372.
- Chaván A. 1969. Leptonacea Gray 1847, pp. 518-537. En: Moore RC (ed.) *Treatise on invertebrate paleontology. Part N, Mollusca (2)*. Geological Society of America and University of Kansas Press: Lawrence.
- Chia FS. 1974. Classification and adaptive significance of developmental patterns in marine invertebrates. *Thalassia Jugoslavica* 10: 121-130.
- Christiansen FB, Fenchel TM. 1979. Evolution of marine invertebrate reproductive Patterns. *Theoretical Population Biology* 16: 267-282.
- Clarke A. 1992. Reproduction in the cold: Thorson revisited. *Invertebrate Reproduction & Development* 22: 175-183.
- Cox LR. 1969. General features of Bivalvia, pp. 2-129. En: Moore RC (ed.) *Treatise on invertebrate paleontology. Part N, Mollusca (6)*. Geological Society of America and University of Kansas Press: Lawrence.
- Crisp DJ, Burfitt A, Rodrigues K, Budd MD. 1983. *Lasaea rubra* an apomictic bivalve. *Marine Biology Letters* 4: 127-136.
- Crisp DJ, Standen A. 1988. *Lasaea rubra* (Montagu) (Bivalvia: Erycinacea), an apomictic crevice-living bivalve with clones separated by tidal level preference. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 117: 27-45.
- Crnčević M, Peharda M, Ezgeta-Balić D, Pećarević M. 2013. Reproductive cycle of *Glycymeris nummaria* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) from Mali Ston Bay, Adriatic Sea, Croatia. *Scientia Marina* 77: 293-300.
- Cross I, Vega L, Rebordinos L. 2002. Análisis cariotípico y variabilidad de los Ag-NOR en *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 18: 221-227.

- Cuevas JM, Martin JP, Bastida R. 2006. Benthic community changes in a Patagonian intertidal: a forty years later comparison. *Thalassas* 22: 29-37.
- Dall WH. 1900. Contributions to the tertiary fauna of Florida, Part 5. *Transactions of the Wagner Free Institute of Science of Philadelphia* 3: 949-1218.
- Dallai R, Lupetti P, Frati F, Nardi F, Afzelius BA. 2001. Binucleate and biflagellate spermatozoa in *Tricholepidion gertschi* Wygodzinsky (Insecta, Zygentoma). *Tissue and Cell* 33: 606-613.
- Davenport J, Chown SL. 1995. Air-breathing by tightly-closed intertidal molluscs: benefits of small size to *Laevilitorina caliginosa* (Gould, 1846) and *Lasaea consanguinea* Smith, 1879 living at Husvik, South Georgia. *Journal of Molluscan Studies* 61: 292-294.
- Davenport J, Wilson PC. 1995. Mobility, gregariousness and attachment in four small bivalve mollusk species at Husvik, South Georgia. *Journal of Molluscan Studies* 61: 491-498.
- Dell RK. 1964. Antarctic and subantarctic Mollusca: Amphineura, Scaphopoda and Bivalvia. *Discovery Reports*. Cambridge University Press 33: 93-250, plates 2-7, text figures 1-4.
- Dell RK. 1971. The marine mollusca of the Royal Society expedition to southern Chile 1958-59. *Records of the Dominion Museum NZ* 7: 155-233.
- Dias-Passos F, Domaneschi O. 2006 A new species of *Mysella* Angas, 1877 (Bivalvia: Galeommatoidea) from Admiralty Bay, King George Island, South Shetlands, Antarctica, with data on its biology and functional anatomy. *Polar Biology* 29: 389-398.
- Dias-Passos F, Domaneschi O. 2009. The anatomical characters related to the brooding behavior of two antarctic species of *Mysella* Angas, 1877 (Bivalvia, Galeommatoidea, Lasaeidae), with direct and indirect evidences of ovoviviparity. *Polar Biology* 32: 271-280.

- Dias-Passos F, Magalhães FT. 2011. A comparative study of the Bivalvia (Mollusca) from the continental shelves of Antarctica and Brazil. *Biota Neotropical* 11: 143-156.
- Dufresne F, Hebert PD. 1994. Hybridization and origins of polyploidy. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences* 258: 141-146.
- Ebert TA, Hernández JC, Russell MP. 2011. Problems of the gonad index and what can be done: analysis of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Marine Biology* 158: 47-58.
- Eckelbarger KJ, Bieler R, Mikkelsen PM. 1990. Ultrastructure of sperm development and mature sperm morphology in three species of commensal bivalves (Mollusca: Galeommatoidea). *Journal of Morphology* 205: 63-75.
- Eckman JE. 1996. Closing the larval loop: linking larval ecology to the population dynamics of marine benthic invertebrates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200: 207-237.
- Erkan M, Sousa M. 2002. Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue and Cell* 34: 262-272.
- Evans HJ. 1960. Supernumerary chromosomes in wild populations of the snail *Helix pomatia* L. *Heredity* 15: 129-138.
- Felip A, Carrillo M, Herráez MP, Zanuy S, Basurco B. 2009. Protocol J - silver staining of NOR regions [Practical guide of protocols: methods of verification of the ploidy]. *Options Méditerranéennes: série B. Etudes et Recherches* 63: 67-70.
- Fernández M. 2006. Características físico-químicas de los sedimentos del Golfo San Jorge y su relación con los organismos bentónicos del sector. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Fernández M, Carreto J, Mora J, Roux A. 2005. Physico-chemical characterization of the benthic ambient of Golfo San Jorge, Argentina.

- Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 85: 1317-1328.
- Forbes E, Hanley S. 1853. A history of British Mollusca, and their shells. Vol. II. Including the remains families of bivalves, the Pteropoda, and Gasteropoda as far as lanthinidae. London. 557 p.
- Forcelli DO. 2000. Moluscos magallánicos. Vázquez-Mazzini Ed., Buenos Aires. 200 p.
- Fox TH, Jespersen Å, Lützen J. 2007. Sperm transfer and reproductive biology in species of hermaphroditic bivalves (Galeommatoidea: Montacutidae). Journal of Morphology 268: 936-952.
- Franzén, Å. 1982. Ultrastructure of the biflagellate spermatozoon of *Tomopteris helgolandica* Greef, 1879 (Annelida, Polychaeta). Molecular Reproduction and Development 6: 29-37.
- Franzén Å. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. Gamete Research 7: 199-214.
- Gabe M. 1968. Techniques Histologiques. Masson et Cie, Paris. 1113 p.
- Gallardo CS. 1993. Reproductive habits and life cycle of the small clam *Kingiella chilena* (Bivalvia: Cyamiidae) in an estuarine sand flat from the South of Chile. Marine Biology 115: 595-603.
- Gallardo MH. 2011. Evolución: el curso de la vida. Ed. Médica Panamericana, Bs. As, 504 p.
- Giese AC. 1959. Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. Annual Review of Physiology 21: 547-576.
- Gordillo S, Coronato AMJ, Rabassa JO. 2005. Quaternary molluscan faunas from the island of Tierra del Fuego after the last glacial maximum. Scientia Marina 69: 337-348.
- Gosling E. 2003. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. John Wiley and Sons, Oxford. 443 p.

- Goto R, Kawakita A, Ishikawa H, Hamamura Y, Kato M. 2012. Molecular phylogeny of the bivalve superfamily Galeommatoidea (Heterodonta, Veneroidea) reveals dynamic evolution of symbiotic lifestyle and interphylum host switching. *BMC Evolutionary Biology* 12: 172-185.
- Gould SJ. 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 41: 587-640.
- Graf DL, Ó Foighil D. 2000. The evolution of brooding characters among the freshwater pearly mussels (Bivalvia: Unionoidea) of North America. *Journal of Molluscan Studies* 66: 157-170.
- Grant A, Tyler PA. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. The analysis of oocyte size/frequency data, and comparison of different types of data. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6: 271-283.
- Guzmán N, Saá S, Ortlieb L. 1998. Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). *Estudios. Oceanológicos* 17: 17-86.
- Hallinan NM, Lindberg DR. 2011. Comparative analysis of chromosome counts infers three paleopolyploidies in the Mollusca. *Genome Biology and Evolution* 3: 1150-1163.
- Havenhand JN. 1995. Evolutionary ecology of larval types, pp. 79-122. En: Mc Edward LR (ed.) *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. CRC Press, NewYork.
- Heath DJ. 1979. Brooding and the evolution of hermaphroditism. *Journal of Theoretical Biology* 81: 151-155.
- Heller J. 1993. Hermaphroditism in molluscs. *Biological Journal of the Linnean Society* 48: 19-42.
- Higgs ND, Reed AJ, Hooke R, Honey DJ, Heilmayer O, Thatje S. 2009. Growth and reproduction in the Antarctic brooding bivalve *Adacnarca nitens* (Philobryidae) from the Ross Sea. *Marine Biology* 156: 1073-1081.

- Hines AH. 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Marine Biology* 69: 309–320.
- Insua A, Thiriot-Quiévreux C. 1992. Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroidea). *Aquatic Living Resources* 5: 1-8.
- Insua A, Labat JP, Thiriot-Quiévreux C. 1994. Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Study* 60: 359-370.
- Isla FI, Iantanos N, Estrada E. 2002. Playas reflectivas y disipativas macromareales del Golfo San Jorge, Chubut. *Revista de la Asociación Argentina de Sedimentología* 9: 155-164.
- Ituarte C. 2009. Unusual modes of oogenesis and brooding in bivalves: the case of *Gaimardia trapesina* (Mollusca: Gaimardiidae). *Invertebrate Biology* 128: 243-251.
- Iwasaki K. 1996. Seasonal changes in size structure and reproduction of the minute galeommatacean bivalve *Lasaea undulata* (Gould) within intertidal mussel beds. *Veliger* 39: 244-249.
- Jara-Seguel P, Peredo S, Parada E. 2005. Registro de poliploidía en la almeja dulceacuícola *Musculium argentinum* (d'Orbigny 1835) (Sphaeriidae, Veneroidea). *Gayana* 69: 36-40.
- Jara-Seguel P, Parada E, Peredo S. 2010. Nuclear DNA content in two Chilean species of *Pisidium* (Veneroidea: Sphaeriidae). *Journal of Shellfish Research* 29: 101-106.
- Jara-Seguel P, Peredo S, von Brand E, Parada E. 2011. Some aspects of the reproductive biology of two populations of *Musculium argentinum* (d'Orbigny, 1835) (Bivalvia: Sphaeriidae) from southern Chile. *Journal of Shellfish Research* 30: 287-294.
- Jespersen Å., Lützen J. 2006. Reproduction and sperm structure in Galeommatidae (Bivalvia, Galeommatoida). *Zoomorphology* 125: 157-173.

- Kabat AR. 1985. The allometry of brooding in *Transennella tantilla* (Gould) (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 91: 271-279.
- Keen AM. 1938. New pelecypod species of the genera *Lasaea* and *Crassinella*. *Proceedings of the Malacological Society, London* 23: 18-32.
- Kelaher BP, Castilla JC, Prado L, York P, Schwindt E, Bortolus A. 2007. Spatial variation in molluscan assemblages from coralline turfs of Argentinean Patagonia. *Journal of Molluscan Studies* 73: 139-146.
- Kirk D, Jones RN. 1970. Nuclear genetic activity in *B*-chromosome rye, in terms of the quantitative interrelationships between nuclear protein, nuclear RNA and histone. *Chromosoma* 31: 241-254.
- Kitajima EW, Paraense WL, Correa LR. 1976. The fine structure of *Schistosoma mansoni* sperm (Trematoda: Digenea). *The Journal of Parasitology* 62: 215-221.
- Konishi K, Kawamura K, Furuita H, Komaru A. 1998. Spermatogenesis of the freshwater clam *Corbicula* aff. *fluminea* Müller (Bivalvia: Corbiculidae). *Journal of Shellfish Research* 17: 185-190.
- Kořínková T, Král J. 2011. Structure and meiotic behaviour of B chromosomes in *Sphaerium corneum* / *S. nucleus* complex (Bivalvia: Sphaeriidae). *Genetica* 139:155-165.
- Korniushin AV. 2002. Morphological characters analysis, the intergroup phylogenetic relationships and possible outgroups of the family Sphaeriidae (Mollusca, Bivalvia). *Vestnik Zoologii* 36: 3-22.
- Korniushin AV. 2004. A revision of some Asian and African freshwater clams assigned to *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774) (Mollusca: Bivalvia: Corbiculidae), with a review of anatomical characters and reproductive features based on museum collections. *Hydrobiologia* 529: 251-270.
- Korniushin AV, Glaubrecht M. 2003. Novel reproductive modes in freshwater clams: brooding and larval morphology in Southeast Asian taxa of *Corbicula* (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). *Acta Zoologica* 84: 293-315.

- Korniushin AV, Glaubrecht M. 2006. Anatomy and reproduction of viviparous *Pisidium (Parapisidium) reticulatum* Kuiper, 1966: Implications for the phylogeny of Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta). *Organisms Diversity and Evolution* 6: 185-195.
- Ladrón de Guevara B, Winkler F, Rodríguez-Romero F, Palma-Rojas C. 1996. Comparative karyology of four American oyster species. *The Veliger* 39: 260-266.
- Lanteri A, Confalonieri V, Rodriguero M. 2010. Formas curiosas de reproducción animal, la partenogénesis. *Ciencia Hoy* 119: 15-22.
- Le Pennec M, Beninger PG. 2000. Reproductive characteristics and strategies of reducing-system bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 126: 1-16.
- Lee T. 1999. Polyploidy and meiosis in the freshwater clam *Sphaerium striatinum* (Lamarck) and chromosome numbers in the Sphaeriidae (Bivalvia, Veneroidea). *Cytologia* 64: 247-252.
- Lee JS, Park JS, Shin YK, Lee YG, Park JJ. 2012. Sequential hermaphroditism in Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Invertebrate Reproduction and Development* 57: 185-188.
- Leitão A, Boudry P, Labat JP, Thiriou-Quévieux C. 1999. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia* 41: 175-186.
- Leitão A, Chaves R 2008. Banding for chromosomal identification in bivalves: A 20-year history. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*; Global Science Books 2: 44-49.
- Leonard JL. 2013. Williams' paradox and the role of phenotypic plasticity in sexual systems. *Integrative and Comparative Biology* 53: 671-688.
- Levan A, Fredga K, Standberg AA. 1964. Nomenclature for centromere position in chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Li XX, Havenhand JN. 1997. Karyotype, nucleolus organizer regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia):

- evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. *Marine Biology* 127: 443-448.
- Li J, Ó Foighil D, Park JK. 2013. Triton's trident: cryptic neogene divergences in a marine clam (*Lasaea australis*) correspond to Australia's three temperate biogeographic provinces. *Molecular Ecology* 22: 1933-1946.
- Linse K. 1997. Die Verbreitung epibenthischer Mollusken im chilenischen Beagle-Kanal. *Berichte zur Polarforschung* 228: 1-131.
- Linse K. 1999. Mollusca of the Magellan region. A checklist of the species and their distribution. *Scientia Marina* 63: 399-407.
- Litulo C. 2005. Fecundity and size at sexual maturity of the fiddler crab *Uca vocans* (Linnaeus, 1578) (Brachyura: Ocypodidae). *Thalassas* 21: 59-64.
- López-Gappa JJ, Sueiro MC. 2007. The subtidal macrobenthic assemblages of Bahía San Sebastián (Tierra del Fuego, Argentina). *Polar Biology* 30: 679-687.
- Lützen J, Berland B, Bristow GA. 2011. Morphology of an endosymbiotic bivalve, *Entovalva nhatrangensis* (Bristow, Berland, Schander and Vo, 2010) (Galeommatoidea). *Molluscan Research* 31: 114-124.
- Lynch JC, Landis JR, Localio AR. 1991. StatXact. *The American Statistician* 45: 151-154.
- Lynch M. 1984. Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *The Quarterly Review of Biology* 59: 257-290.
- Marincovich L. 1973. Intertidal mollusks of Iquique, Chile. *Natural History Museum Los Angeles County, Science Bulletin* 16: 1-49.
- Martin JP, Garese A, Sar A, Acuña FH. 2015. Fouling community dominated by *Metridium senile* (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) in Bahía San Julián (southern Patagonia, Argentina). *Scientia Marina* 79: 211-221.
- Martínez-Expósito MJ, Pasantes JJ, Méndez J. 1994. NOR activity in larval and juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 175: 155-165.

- Martínez-Lage A, González-Tizón A, Méndez. J. 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72: 242-249.
- Martínez-Lage A, Insua A. 1997. El genoma de los moluscos bivalvos: aspectos moleculares y evolutivos, pp. 85-98. En: Organización y evolución del genoma eucariota. Marcadores moleculares. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular (A Coruña, 1996). Josefina Méndez Felpeto (coord.): A Coruña Universidade
- Mc Grath D, Ó Foighil D. 1986. Population dynamics and reproduction of hermaphroditic *Lasaea rubra* (Montagu) (Bivalvia, Galeommatacea). *Ophelia* 25: 209-219.
- Melvill JC, Standen R. 1914. Notes on Mollusca collected in the North-west Falklands. *The Annals and Magazine of Natural History including Zoology, Botany, and Geology. Eighth Series* 13: 110-113.
- Mikkelsen PM, Bieler R, Kappner I, Rawlings TA. 2006. Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 439-521.
- Molleda PE, de Severeyn YG, Severeyn H, Molina J. 1999. Determinación del número de cromosomas de *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae) utilizando dos métodos citogenéticos. *Ciencia* 7: 17-22.
- Montagu G. 1803. *Testacea britannica or natural history of british shells, marine, land and fresh-water, including de most minute: systematically arranged and embellished with figures. Part 1*, London. 637 p.
- Morton B. 1992. Seasonal variations in brood size of *Lasaea* cf. *nipponica* (Bivalvia: Galeommatoidea) in Hong Kong. *American Malacological Bulletin* 9: 165-171.
- Morton B. 2015. The biology and functional morphology of the placental embryo-brooding *Neolepton salmoneum*, a comparison with *Neolepton*

- subtrigonum* (Bivalvia: Cyamioidea: Neoleptonidae), and a discussion of affinities. American Malacological Bulletin 33:1-21.
- Morton JE. 1954. The crevice faunas of the upper intertidal zone at Wembury. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 33: 187-224.
- Morton JE. 1956. The tidal rhythm and action of the digestive system of the lamellibranch *Lasaea rubra*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 35: 563-586.
- Morton JE. 1960. The responses and orientation of the bivalve *Lasaea rubra* Montagu. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 39: 5-26.
- Morton JE, Boney AD, Corner EDS. 1957. The adaptations of *Lasaea rubra* (Montagu), a small intertidal lamellibranch. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 36: 383-405.
- Nakamura HK. 1985. A review of molluscan cytogenetic information based in the CISMOCH - computerized index system for molluscan chromosomes. Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda. Venus 44: 193-225.
- Nation JL. 1983. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. Biotechnic and Histochemistry 58: 347-351.
- Ockelmann KW, Kirsten M. 1978. The biology, ecology and behavior of the bivalve *Mysella bidentata* (Montagu). Ophelia 17: 1-93.
- Ockelmann KW & Warén A. 1998. Taxonomy of and biological notes on the bivalve genus *Microgloma*, with comments on protobranch nomenclature, Ophelia 48: 1-24.
- Ó Foighil D. 1985. Fine structure of *Lasaea subviridis* and *Mysella tumida* sperm (Bivalvia, Galeommatacea). Zoomorphology 105: 125-132.
- Ó Foighil D. 1986. Prodissoconch morphology is environmentally modified in the brooding bivalve *Lasaea subviridis*. Marine Biology 92: 517-524.

- Ó Foighil D. 1987. Cytological evidence for self-fertilization in *Lasaea subviridis* (Galeommatacea: Bivalvia). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 12: 83-90.
- Ó Foighil D. 1988. Random mating and planktotrophic larval development in the brooding hermaphroditic clam *Lasaea australis* (Lamarck, 1818). *The Veliger* 31: 214-221.
- Ó Foighil D. 1989. Planktotrophic larval development is associated with a restricted geographic range in *Lasaea*, a genus of brooding, hermaphroditic bivalves. *Marine Biology* 103: 349-358.
- Ó Foighil D, Eernisse DJ. 1988. Geographically widespread, non-hybridizing, sympatric strains of the hermaphroditic, brooding clam *Lasaea* in the northeastern Pacific Ocean. *The Biological Bulletin* 175: 218-229.
- Ó Foighil D, Jennings R, Park JK, Merriwether DA. 2001. Phylogenetic relationships of mid-oceanic ridge and continental lineages of *Lasaea* spp. (Mollusca: Bivalvia) in the northeastern Atlantic. *Marine Ecology Progress Series* 213:165-175.
- Ó Foighil D, Jozefowicz CJ. 1999. Amphi-Atlantic phylogeography of direct-developing lineages of *Lasaea*, a genus of brooding bivalves. *Marine Biology* 135: 115-122.
- Ó Foighil D, Smith MJ. 1995. Evolution of asexuality in the cosmopolitan marine clam *Lasaea*. *Evolution* 49:140-150.
- Ó Foighil D, Smith MJ. 1996. Phylogeography of an asexual marine clam complex, *Lasaea*, in the northeastern Pacific based on cytochrome oxidase III sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 134-142.
- Ó Foighil D, Thiriote-Quévieux C. 1991. Ploidy and pronuclear interaction in northeastern Pacific *Lasaea* clones (Mollusca: Bivalvia). *The Biological Bulletin* 181: 222-231.
- Ó Foighil D, Thiriote-Quévieux C. 1999. Sympatric Australian *Lasaea* species (Mollusca: Bivalvia) differ in their ploidy levels, reproductive modes and

- developmental modes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 127: 477-494.
- Oldfield E. 1955. Observations on the anatomy and mode of life of *Lasaea rubra* (Montagu) and *Turtonia minuta* (Fabricius). *Journal of Molluscan Studies* 31: 226-249.
- Oldfield E. 1961. The functional morphology of *Kellia suborbicularis* (Montagu), *Montacuta ferruginosa* (Montagu) and *M. substriata* (Montagu), (Mollusca, Lamellibranchiata). *Journal of Molluscan Studies* 34: 255-295.
- Oldfield E. 1963. The reproduction and development of some members of the Erycinidae and Montacutidae (Mollusca, Eulamellibranchiata). *Journal of Molluscan Studies* 36: 79-120.
- Orensanz JML, Schwindt E, Pastorino G, Bortolus A, Casas G, Darrigran G, Vallarino EA. 2002. No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern Atlantic. *Biological Invasions* 4: 115-143.
- Ortiz-Galarza KJ, Iannaccone J, Perea de la Matta Á, Díaz BB. 2011. Biología reproductiva de la "concha corazón" *Trachycardium procerum* (Sowerby, 1833) (Cardiidae, Pelecypoda) de Chimbote, Perú. *The Biologist* 9: 66-97.
- Packard GC, Boardman TJ. 1999. The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: molecular & integrative physiology* 122: 37-44.
- Pan Y, Li Q, Yu R, Wang R. 2004. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Aquatic Living Resource* 17: 201-206.
- Park GM, Yong TS, Im K, Chung EY. 2000. Karyotypes of three species of *Corbicula* (Bivalvia: Veneroidea) in Korea. *Journal of Shellfish Research* 19: 979-982.

- Park JK, Ó Foighil D. 2000. Genetic diversity of oceanic island *Lasaea* (Mollusca: Bivalvia) lineages exceeds that of continental populations in the Northwestern Atlantic. *The Biological Bulletin* 198: 396-403.
- Pastorino G. 1994. Moluscos costeros recientes de Puerto Pirámide, Chubut, Argentina. *Miscelánea* 93. Academia Nacional de Ciencias (Córdoba, Argentina). 30 p.
- Pearse JS, McClintock JB, Bosch I. 1991. Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempos, modes, and timing. *American Zoologist* 31: 65-80.
- Pechenik JA. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series* 177: 269-297.
- Petersen GH, Lützen J. 2008. Morphology of *Mysella moelleri* (Mörch, 1877) and *Mysella sovaliki* MacGinitie, 1959 (Bivalvia: Galeommatoidea: Montacutidae), with notes on their biology. *Steenstrupia* 29: 67-79.
- Petkevičiūtė R, Stanevičiūtė G, Stunžėnas V, Lee T, Ó Foighil D. 2007. Pronounced karyological divergence of the North American congeners *Sphaerium rhomboideum* and *S. occidentale* (Bivalvia: Veneroidea: Sphaeriidae) *Journal of Molluscan Studies* 73: 315-321.
- Petkevičiūtė R, Stunžėnas V, Stanevičiūtė G. 2006. Polymorphism of the *Sphaerium corneum* (Bivalvia, Veneroidea, Sphaeriidae) revealed by cytogenetic and sequence comparison. *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 53-64.
- Philippi RA. 1845. Diagnosen einiger neuen Conchylien. *Archiv Naturgeschichte* 2: 50-71.
- Pigneur LM, Hedtke SM, Etoundi E, van Doninck K. 2012. Androgenesis: a review through the study of the selfish shellfish *Corbicula* spp. *Heredity* 108: 581-591.

- Pitnick S, Hosken DJ, Birkhead TR. 2008. Sperm morphological diversity, pp. 69-149. En: Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (eds.) Sperm biology: An evolutionary perspective, Elsevier/Academic Press.
- Ponder WF. 1971. Some New Zealand and subantarctic bivalves of the Cyamiacea and Leptonacea with descriptions of new taxa. Records of the Dominion Museum of New Zealand 7:119-141.
- Popham JD. 1974. Comparative morphometrics of the acrosomes of the sperms of "externally" and "internally" fertilizing sperms of the shipworms (Teredinidae, Bivalvia, Mollusca). Cell and Tissue Research 150: 291-297.
- Popham JD. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. Malacological Review 12: 1-20.
- Popham ML. 1940. The mantle cavity of some of the Erycinidae, Montacutidae and Galeommatidae with special reference to the ciliary mechanisms. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 24: 549-587.
- Powell AWB. 1951. Antarctic and Subantarctic Mollusca: Pelecypod and Gastropoda. Discovery Reports 26: 49-196 (más 10 lám.).
- Qui A, Shi A, Komaru A. 2001. Yellow and brown shell color morphs of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) from Sichuan Province, China, are triploids and tetraploids. Journal of Shellfish Research 20: 323-328.
- Quinn GGP, Keough MJ. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge: Cambridge University Press. 537 p.
- Ramírez-Llodra E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. Advances in Marine Biology 43: 87-170.
- Rècluz AE. 1843. Monographie du genre *Poronie*. Revue Zoologique, par la Société Cuvierienne (Paris) 6: 166-177.
- Reed AJ, Thatje S, Linse K. 2013. An unusual hermaphrodite reproductive trait in the Antarctic brooding bivalve *Lissarca miliaris* (Philobryidae) from the Scotia Sea, southern ocean. Polar Biology 36: 1-11.

- Richardson MG. 1979. The ecology and reproduction of the brooding antarctic bivalve. *British Antarctic Survey Bulletin* 49: 91-115.
- Ripley BJ, Caswell H. 2008. Contributions of growth, stasis, and reproduction to fitness in brooding and broadcast spawning marine bivalves. *Population Ecology* 50: 207-214.
- Rybalkina (Dzyuba) SM, Maiorova MA, Anisimov AP, Kravchenko DN. 2013. The gametogenesis and sexual cycle of the bivalve *Corbicula japonica* Prime (1864) in the mouth of the Kievka River (sea of Japan). *Russian Journal of Marine Biology* 39: 253-264.
- Sastry AN. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae), pp. 113-292. En: Giese AC, Pearse JS (eds.). *Reproduction of marine invertebrates. Vol V. Molluscs: Pelecypods and lesser classes*. California: Academic Press, Inc. London.
- Scarabino F. 2003. Lista sistemática de los Bivalvia marinos y estuarinos vivientes de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 8: 229-259.
- Seed R, O'Connor RJ. 1980. Shell shape and seasonal changes in population structure in *Lasaea rubra* (Bivalvia: Erycinidae). *Journal of Molluscan Studies* 46: 66-73.
- Siegel S, Castellan NJ. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill international, Statistics Series, New York. 399 p.
- Simon JC, Delmotte F, Risper C, Crease T. 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 151-163.
- Skuza L, Labecka AM, Domagala J. 2009. Cytogenetic and morphological characterization of *Corbicula fluminalis* (O. F. Müller, 1774) (Bivalvia: Veneroida: Corbiculidae): taxonomic status assessment of a freshwater clam. *Folia Biologica* 57: 177-185.

- Soot-Ryen T. 1951. Antarctic pelecypods. Scientific Results of the Norwegian Antarctic Expeditions 1927-1928 32: 1-46.
- Soot-Ryen T. 1959. Reports of the Lund University Chile Expedition 1948-49. 35. Pelecypoda. Lunds Universitets Arsskrift 55: 1-86.
- Sponaugle S, Cowen RK, Shanks A, Morgan SG, Leis JM., Pineda J, Boehlert GW, Kingsford MJ, Lindeman KC, Grimes C, Munro JL. 2002. Predicting self-recruitment in marine populations: biophysical correlates and mechanisms. Bulletin of Marine Science 70: 341-375.
- Stempell W. 1902. Die Muscheln der Sammlung Plate. (Systematische Uebersicht), p. 217-249, pl. 12. In Plate L. Fauna Chilensis. Zoologische Jahrbücher Suppl. 5.
- Stenberg P, Saura A. 2009. Cytology of asexual animals, pp. 63-74. En: Shön I; Martens K, van Dijk P (eds.) Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis. Springer.
- Strathmann RR, Strathmann MF. 1982. The relationship between adult size and brooding in marine invertebrates. American Naturalist 119: 91-101.
- Strathmann RR, Strathmann MF, Emson RH. 1984. Does limited brood capacity link adult size, brooding, and simultaneous hermaphroditism? A test with the starfish *Asterina phylactica*. The American Naturalist 123: 796-818.
- Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: 304-306.
- Taylor DJ, Ó Foighil D. 2000. Transglobal comparisons of nuclear and mitochondrial genetic structure in a marine polyploidy clam (*Lasaea*, Lasaeidae). Heredity 84: 321-330.
- Thiriot-Quévieux C. 1992. Karyotype of *Lasaea australis*, a brooding bivalve species. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 43: 403-408.
- Thiriot-Quévieux C. 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. Cahiers de Biologie Marine 43: 17-26.

- Thiriot-Quévèreux C, Insua-Pombo AM, Albert P. 1989. Polyploidie chez un Bivalve incubant, *Lasaea rubra* (Montagu). Comptes Rendu de l'Academie des Sciences Paris 308: 115-120.
- Thiriot-Quévèreux C, Soyer J, de Bovée F, Albert P. 1988. Unusual chromosome complement in the brooding bivalve *Lasaea consanguinea*. Genetica 76:143-151.
- Thorson G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biological Reviews 25: 1-45.
- Tomlinson J. 1966. The advantage of hermaphroditism and parthenogenesis. Journal of Theoretical Biology 11: 54–58
- Trueman JW. 1999. The enigmatic australian endemic species *Hemiphlebia mirabilis* Selys (Zygoptera: Hemiphlebioidea): four short observations and a new record. International Journal of Odonatology 2: 115-121.
- Tyler-Walters H, Crisp DJ. 1989. The modes of reproduction in *Lasaea rubra* (Montagu) and *L. australis* (Lamarck) (Erycinidae; Bivalvia), pp. 299-308. En: Ryland JS, Tyler PA (eds.) Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms. Proceedings of the 23rd European Marine Biology Symposium, (Swansea, 1988). Denmark: Olsen and Olsen.
- Tyler-Walters H, Davenport J. 1990. The relationship between the distribution of genetically distinct inbred lines and upper lethal temperature in *Lasaea rubra*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 70: 557-570.
- Tyler-Walters H, Hawkins AR. 1995. The application of rapid markers to study of the bivalve mollusk *Lasaea rubra*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 75: 563-569.
- Valentich-Scott P, Ó Foighil D, Li J. 2013. Where's *Waldo*? A new commensal species, *Waldo arthuri* (Mollusca, Bivalvia, Galeommatidae), from the northeastern pacific ocean. Zookeys 316: 67-80.
- Vance RR. 1973. On reproductive strategies in marine benthic invertebrates. American Naturalist 107: 339-352.

- Vinuesa, J.H. 1981. El ciclo sexual del mejillín patagónico *Brachydontes purpuratus* (Lmk.) en Puerto Deseado. *Physis*, 39: 1-10.
- Vinuesa JH. 2005. Distribución de crustáceos decápodos y estomatópodos del Golfo San Jorge. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40: 7-21.
- Watson NA. 1999. Intrageneric variation in spermiogenesis, spermatozoa, and ocelli in *Pogaina* (Platyhelminthes, Rhabdocoela, Provorticidae). *Invertebrate Biology* 18: 243-257.
- Wilson CG, Sherman PW. 2010. Anciently asexual bdelloid rotifers escape lethal fungal parasites by drying up and blowing away. *Science* 327: 574-576.
- Zaixso HE, Boraso de Zaixso AL, Pastor de Ward CT, Lizarralde ZI, Dadón J, Galván D. 2015. El bentos costero patagónico, pp. 43-152. En: Zaixso HE, Boraso A (eds.). *La zona costera patagónica argentina, Vol. II. Comunidades Biológicas y Geología*. Editorial Universitaria Patagónica, Comodoro Rivadavia.
- Zaixso HE, Pastor CT. 1977. Observaciones sobre la ecología de los mitílidos de la ría Deseado. I. Distribución y análisis biocenótico. *Ecosur (Argentina)* 4: 1-46.
- Zelaya DG. 2005. The bivalves from the Scotia Arc islands: species richness and faunistic affinities. *Scientia Marina* 69(S2): 113-122.
- Zelaya DG, Güller M. 2014. Bivalvia, pp 147-161. En: Calcagno JA (ed.) *Los invertebrados marinos*. Editorial Vázquez Mazzini. Buenos Aires.
- Zelaya DG, Ituarte C. 2004. The genus *Neolepton* Monterosato, 1875 in southern south America (Bivalvia: Neoleptonidae). *Journal of Molluscan Studies* 70: 123-137.
- Zelaya DG, Ituarte C. 2009. A redefinition of *Pseudokellya* Pelseneer, 1903 (Bivalvia: Cyamiidae) and the description of a new species from the southern Ocean. *Nautilus* 123: 1-8.

- Zelaya DG, Ituarte C. 2012. *Tellimya tehuelcha*, new species: first record of *Tellimya* Brown, 1827, in south America (Bivalvia: Lasaeidae), with notes on life history and reproduction. *Malacologia* 55(1): 173-182.
- Zhang Q, Yu G, Cooper RK, Tiersch TR. 1999. High resolution analysis of karyotypes prepared from different tissues of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 18: 115-120.
- Zumoff CH. 1973. The reproductive cycle of *Sphaerium simile*. *Biological Bulletin* 144: 212-228.

ANEXO

ANEXO

UBICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *LASAEA* Y DESCRIPCIÓN DE ESPECIES

Ubicación taxonómica de la superfamilia Galeommatoidea y el género *Lasaea*

La subclase Heterodonta (Clase Bivalvia) incluye, entre otros, el orden Veneroida Gray 1854 con la superfamilia Galeommatoidea Gray, 1840, donde se ubica la familia Lasaeidae Gray, 1842 (Bieler y Mikkelsen 2006; Zelaya y Güller 2014; Bouchet 2018).

La ubicación de la superfamilia Galeommatoidea está en constante cambio (Goto *et al.* 2012). En tal sentido, algunos trabajos sugieren sólo dos familias: Galeommatidae y Lasaeidae (Bieler *et al.* 2010; Goto *et al.* 2012). Publicaciones recientes, indican que la superfamilia Galeommatoidea incluye tres familias aceptadas: Basterotiidae Cossmann, 1909; Galeommatidae Gray, 1840 y Lasaeidae Gray, 1842 (Goto *et al.* 2016; Bouchet 2018).

El género *Lasaea* no está ajeno a estas discrepancias y resulta taxonómicamente complejo. De acuerdo a la base de datos WoRMS (2018), la familia Lasaeidae comprende 80 géneros aceptados (38 pertenecen a la subfamilia Montacutinae), entre los que se encuentra el género *Lasaea* (Tabla A-1) (Bouchet 2018).

Lasaea Brown, 1827 es un género cosmopolita perteneciente a la familia Lasaeidae Gray, 1842 constituida por un grupo taxonómicamente complejo de pequeños bivalvos intermareales (Ó Foighil y Eernise 1988). Desde las primeras descripciones de los ejemplares tipo de cada especie hasta la actualidad, este género ha sufrido numerosas modificaciones en su sistemática. Este anexo proporciona una introducción al tema que permitirá, en

lo sucesivo, clarificar la posición taxonómica de las ejemplares patagónicos de *Lasaea*, las que han sido nombradas de distinta forma.

El género *Lasaea* aceptado actualmente como tal, ha sido citado en las descripciones originales con diversas denominaciones a saber: *Anapa* Gray, 1842; *Bornia seminulum* Philippi, 1836; *Cardium rubrum* (Montagu, 1803); *Cycladina* Cantraine, 1835; *Kellia* (*Poronia*) *rubra* (Montagu 1803); *Kellia rubra* Turton, 1848; *Lasaea rubra* (Brown 1827); *Lepton adansoni* (Gmelin 1791); *Poronia rubra* Rècluz, 1843; *Tellina rubra* Turton, 1819; (Forbes y Hanley 1853; Bouchet 2018).

Montagu (1803) realizó la primera descripción sintética del holotipo de una especie de *Lasaea*, el que se halla depositado bajo el nombre de *Cardium rubrum* Montagu, 1803; y en la actualidad es considerado un ejemplar de *Lasaea rubra* (Montagu, 1803) (Tabla A-1). El ejemplar descrito está caracterizado por una valva roja lisa, de aspecto globoso, brillante y translúcida, redondeada en ambos extremos y con un umbo prominente; el ligamento interno desplazado del umbo con una charnela que presenta dientes cardinales pequeños y dientes laterales muy conspicuos. De acuerdo a las observaciones de ese autor, el diminuto ejemplar no sobrepasa los 3,17 mm de longitud, medida como la distancia máxima entre borde anterior y posterior de la conchilla. En 1827 en un libro referido a las ilustraciones de la conchología de Gran Bretaña e Irlanda y posteriormente en 1833 en el libro de texto correspondiente a esas imágenes, Brown amplía la descripción del género *Lasaea*, agregando que se trata de bivalvos equivalvos e inequilaterales (Fig. A-1).

En 1853, Forbes y Hanley realizan una descripción más detallada de las características de la valva, describiendo los individuos recolectados en las costas de Gran Bretaña como *Kellia* (*Poronia*) *rubra* Montagu y considerando como sinónimos a *Lepton adansoni* (Gmelin 1791), *Cardium rubrum* Montagu, 1803; *Tellina rubra* Turton, 1819; *Kellia rubra* Turton, 1848; *Bornia seminulum* Philippi, 1836; *Poronia rubra* Rècluz, 1843 y *Lasaea rubra* Brown, 1827, actualmente aceptada esta última combinación (Bouchet 2018). De acuerdo a

estos autores, a pesar del tamaño pequeño de los individuos, la valva rígida, fuerte y con aspecto globoso, semi-transparente y carente de brillo; presenta en general un color rojo violáceo ó variaciones en tonos de amarillo con rosa púrpura en el extremo más largo y moteado ó en bandas cerca del umbo; en ocasión se pueden encontrar ejemplares con una coloración verdosa sucia ó carentes de color. La forma es generalmente oval-circular, más larga que alta y relativamente oblicua; aunque en raras ocasiones el alto y la longitud son iguales y, en consecuencia, se acerca a una forma circular. La superficie, a pesar de tener irregularidades, carece de esculturas visibles. Las valvas son inequilaterales y la parte posterior ocupa al menos las tres quintas partes de la longitud total respecto de la posición del umbo. El margen posterior es ligeramente aguzado, en tanto el margen anterior es más amplio. El margen ventral es curvado; el margen dorsal delantero es corto, recto y más inclinado, el margen dorsal trasero es apenas inclinado y más curvado que el anterior; no se observa lúnula. La parte interna de las valvas suele presentar un aspecto resinoso de color más intenso que el del exterior; todo el margen de la charnela es casi siempre de color rojo púrpura oscuro. La dentición de la valva derecha consiste en un pequeño diente central agudo con una foseta grande justo detrás del umbo; el margen anterior de la charnela es extraordinariamente grueso en ambas valvas, formando una cavidad amplia pero poco profunda para el ligamiento largo, que se halla ubicado a lo largo del borde interior de la misma. La otra valva contiene un pequeño diente lateral anterior y un diente del tipo laminar oblicuo al margen de la charnela, rematado frecuentemente cerca del inicio con un pequeño dentículo apical, justo detrás del umbo. Los especímenes observados sin desgaste, o cuando éstos son analizados bajo una lupa de poco aumento, muestran una charnela amplia con una foseta triangular por debajo del umbo. Forbes y Hanley (1853) manifiestan que *Lasaea rubra* tiene una longitud promedio de 3,63 mm y 2,72 mm de alto, sin aclarar sobre cuántos individuos fueron realizadas las mediciones.

A su vez, Forbes y Hanley (1853) remarcan que, si bien los individuos son de tamaño pequeño, no han sido escasos los trabajos que se han realizado

para analizar cuidadosamente la parte interna del animal. De acuerdo a estos autores, el manto es de color blanco, cerrado en la parte posterior y abierto en la parte delantera, donde sobresale el pie robusto, amplio en la base. El margen del manto es bastante liso y libre de tentáculos. De acuerdo con algunas observaciones, este animal es vivíparo, encontrándose en verano repleto de juveniles con valvas, perfectamente formados. Estos mismos autores definen a *Lasaea rubra* como estrictamente litoral, indicando que vive en forma gregaria en grietas de las rocas, entre *Corallina*, *Lichina* y *Fucus* y congregaciones de cirripedios del intermareal.

Tradicionalmente, la sistemática de *Lasaea* se ha basado en la morfología de las valvas para identificar las distintas especies. Sin embargo, algunos trabajos remarcan que el género presenta grandes variaciones morfológicas, incluso entre los individuos recolectados en una misma localidad, dificultando su identificación taxonómica (Dall 1900; Ponder 1971; Ó Foighil 1986, 1988; Ó Foighil y Eernisse 1988). Por ejemplo, Keen (1938) cita más de cuarenta especies distintas de *Lasaea* de acuerdo a variaciones morfológicas y de color, distribuidas cada una de ellas en áreas geográficas distintas ó incluso, entre niveles en el intermareal. Ponder (1971), por su parte, concluye que la mayoría de las especies nominales citadas por Keen (1938) serían subespecies regionales o ecotipos de la especie tipo del género, *L. rubra*. Una compilación actualizada publicada por la base de datos sobre especies marinas WoRMS (2018) cita para el género *Lasaea* un total de veintitres especies con estatus aceptado entre las que se encuentra una especie fósil (Tabla A-1) (Bouchet 2018).

Para las costas sudamericanas (Pacífico, Atlántico e islas sub-antárticas), se han citado bajo diversos nombres varias especies que se ubican actualmente en el género *Lasaea* incluyendo a *L. adansoni* (Gmelin, 1791), *L. petitiana* (Rècluz, 1843), *L. miliaris* (Philippi, 1845), *L. consanguinea* (Smith, 1879); *L. macrodon* (Stempell, 1902) y *L. helenae* (Soot-Ryen, 1959) (Tabla A-2).

Rècluz (1843), describe para las costas del Callao (Perú) la especie *Poronia petitiana*, considerada actualmente sinónimo de *Lasaea petitiana* (Soot-Ryen 1959; Bouchet 2018). Los ejemplares a los que hace referencia, presentan una valva ovalada u ovalada-triangular inequilateral, convexa, de color blanco rosado, semi-estriada en forma transversal con pequeñas puntuaciones de color rosa a cada lado y en los dientes, de coloración menos intensa que *Lasaea adansoni* (mencionada como *Poronia adansoni*); la charnela presenta hendiduras anchas en el ligamiento y un poco más delgadas hacia los márgenes de las valvas (Figs. A-1b y A-2c-d).

Lasaea miliaris fue descrita por Philippi (1845) bajo el nombre de *Kellia miliaris* para el Estrecho de Magallanes (bahía Eagle, Chile) como un bivalvo de tamaño semejante a *K. seminulum* (= *Bornia seminulum* Philippi 1836, actualmente sinónimo de *L. rubra*) (Bouchet 2018). El autor, describe un ejemplar de color similar o más oscuro, difícilmente distinguible de la especie característica de la costa mediterránea (*L. adansoni*); con conchilla ligeramente más larga y angosta y con estrías más prominentes que *L. adansoni* recolectada en el Mediterráneo; similar en cambio, a *Poronia rubra* (otro sinónimo de *L. rubra*) procedente de las costas de Groenlandia (Figs. A-1f y A-2b).

En 1902, Stempell describe a *Lasaea macrodon* como especie nueva a partir de muestras recolectadas en el Archipiélago Juan Fernández (bahía Padres, Chile). En su descripción hace referencia a ejemplares de valva ovalada, delgada, de aspecto traslúcido, globosa. El contorno presenta una forma asimétrica con la parte frontal más larga que la trasera; de coloración amarillenta más rojiza hacia el umbo; la parte interna de color blanquecino con manchas rojizas en la zona del ligamiento. Los ejemplares presentan dos dientes cardinales en el lado izquierdo y uno solo del lado derecho; la valva izquierda exhibe hendiduras donde encastra el diente cardinal; el ligamento se encuentra en una oquedad en forma paralela al borde. Los ejemplares más grandes no superaron los 3 mm de ancho, 4,5 mm de alto y 5,5 mm de largo (datos tomados de la serie tipo, n=3) (Figs. A-1g-h).

Finalmente, Soot-Ryen (1959) describe una nueva especie, *Lasaea helenae*, para la localidad de Iquique (Chile). El holotipo de la misma corresponde a un individuo de valva pequeña (largo: 2,5 mm), de contorno cuadrado con el margen ventral ligeramente curvo, el margen posterior curvado de modo uniforme hacia el umbo y el margen anterior casi recto. El color es principalmente amarillento, por lo general con un rojo brillante a los lados del ligamento. La valva presenta ornamentación claramente onduladas de líneas concéntricas junto a las líneas de crecimiento más irregulares. El ligamento es fuerte, observándose cicatrices en las zonas de los aductores y la línea paleal a menudo es de color rojo. Esta especie se reconoce fácilmente por la forma, color y ornamentación; a menudo se relaciona con *L. macrodon*, del Archipiélago Juan Fernández (Chile) pero presenta una forma muy diferente (Fig. A-2e).

En su catálogo sobre moluscos marinos de la provincia magallánica, Carcelles y Williamson (1951) incluyen, además de las especies mencionadas por otros autores para esta región, a *Lasaea magellanica* y a *L. cycladiformis*, actualmente dentro del género *Kellia*. Asimismo, para esta región magallánica han se han citado las especies *L. adansoni* (Carcelles y Williamson 1951; Pastorino 1994; Forcelli 2000; Scarabino 2003; Zelaya 2005), con localidad tipo en Senegal y *L. consanguinea* (Melville y Standen 1914; Powell 1951) con localidad tipo en las Islas Kerguelen (Tabla A-2).

En su descripción original, Smith (1879) se refiere a *Kellia consanguinea* (= *L. consanguinea*) como individuos de valva con lados desiguales, oblicuamente oval, algo más estrechos en la parte posterior; las valvas de color rosa en la parte inferior y rojo más cerca del umbo, con una coloración rosa pálido en el interior; la parte externa de la valva presenta un rayado concéntrico. De acuerdo al autor, el umbo tiene un tamaño aproximadamente igual a un tercio de la longitud; presenta una línea cardinal curva de color rosa-púrpura; un diente cardinal cónico en la valva derecha debajo del umbo (que encastra en un pequeño surco en la valva izquierda); los márgenes anterior y posterior de las valvas son generalmente curvos. De acuerdo a su descripción,

a simple vista esta especie podría ser fácilmente confundida con *L. adansoni*. Sin embargo, presenta una estructura más fuerte, con un periostraco más grueso y con una forma transversalmente más alargada; las ornamentaciones en su superficie parecieran ser puntuadas, a diferencia de *L. adansoni* que muestra estrías radiadas; en su descripción, Smith hace referencia a las diferencias encontradas en la dentición respecto de *L. rubra*, aunque no detalla cuales. El autor reconoce también un parecido de *L. consanguinea* con *L. miliaris*, aunque considera que esta última presenta una coloración distinta, que carece de periostraco y que el umbo es más prominente (Figs. A-1c-d y Fig. A-2a).

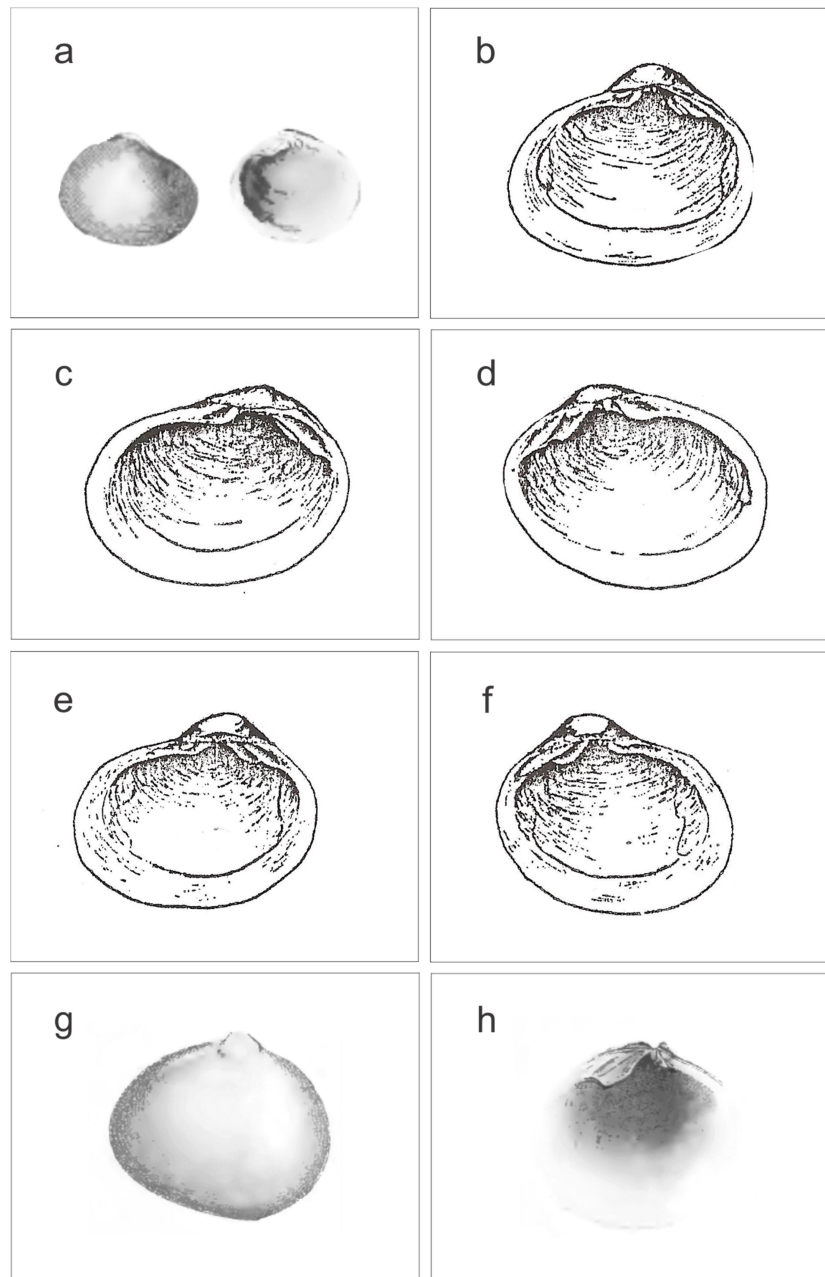


Figura A-1. a) *Lasaea rubra* (Montagu): holotipo (ilustrado por Brown 1827); b) *L. petitiana* (Rècluz): ejemplar tomado de la serie para la localidad tipo presentada por Petit a Rècluz (ilustrado por Dell 1971); c) y d) *L. consanguinea* (Gmelin): ejemplar tomado de la serie tipo (ilustrado por Dell 1971); e) y f) *L. miliaris* (Philippi): probablemente sintipo (ilustrado por Dell 1971); g) *L. macrodon* (Stempell): holotipo y h) *L. macrodon*: detalle de la charnela (Stempell 1902).

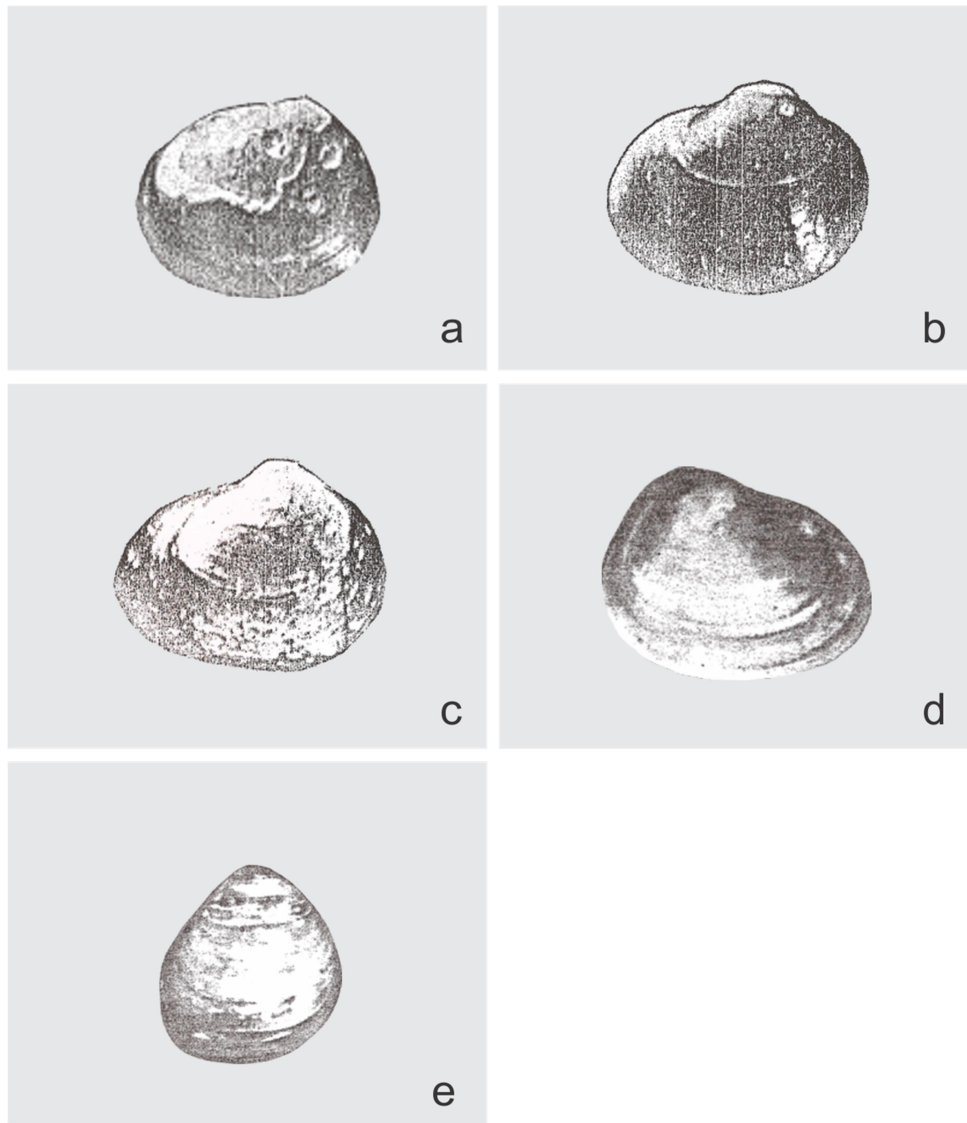


Figura A-2. a) *Lasaea consanguinea* (Gmelin): sintipo (tomado de Dell 1971); b) *L. miliaris* (Philippi): sintipo (tomado de Dell 1971); c) *L. petitiana* (Rècluz): sintipo (tomado de Dell 1971); d) *L. petitiana* (Rècluz): probablemente holotipo (?) (tomado de Soot-Ryen 1959); e) *L. helenae* (Soot-Ryen): holotipo (tomado de Soot-Ryen 1959).

Tabla A-1 Registro de nombre asignados y aceptados al género *Lasaea*; de acuerdo a la base de datos WoRMS (*World Register of Marine Species* 2018).

	Nombre	Autor	Estatus	Distribución citada
Clase	Bivalvia	Linnaeus, 1758		
Subclase	Heterodonta	Neumayr, 1884		
Orden	Veneroida	Gray, 1854		
Superfamilia	Galeommatoidea	Gray, 1840		
Familia	Lasaeidae	Gray, 1842		
Género	<i>Lasaea</i>	Brown, 1827	aceptado	
sinonimias	<i>Anapa</i>	Gray, 1842	no aceptado	
	<i>Cycladina</i>	Cantraine, 1835	no aceptado	
	<i>Poronia</i>	Rècluz, 1843	no aceptado	
Especie	<i>Lasaea adansoni</i>	(Gmelin, 1791)	aceptado	E Atlánt. – Mediter.
	<i>Lasaea australis</i>	(Lamarck, 1818)	aceptado	SE Australia
	<i>Lasaea bermudensis</i>	Bush, 1899	aceptado	
	<i>Lasaea cystula</i>	Keen 1938	aceptado	W Pacífico
	<i>Lasaea colmani</i>	Ó Foighil y Thiriot-Quévieux, 1999	aceptado	SE Australia
	<i>Lasaea consanguinea</i>	(E. A. Smith, 1879)	aceptado	Antártica – I. subantárt.
	<i>Lasaea dingleyi</i>	Laws, 1950	aceptado (fósil)	Nueva Zelanda
	<i>Lasaea eastera</i>	Raines y Huber, 2012	aceptado	I. de Pascua – I. Salas y Gómez (Chile)
	<i>Lasaea hawaiiensis</i>	Dall, Bartsch y Rehder, 1938	aceptado	Oceanía –W Pacífico
	<i>Lasaea helenae</i>	Soot-Ryen, 1959	aceptado	Perú, Chile
	<i>Lasaea hinemoa</i>	Finlay, 1928	aceptado	NE Nueva Zelanda
	<i>Lasaea macrodon</i>	Stempell 1902	aceptado	Ar. Juan Fernández
	<i>Lasaea maoria</i>	(Powell, 1933)	aceptado	Nueva Zelanda
	<i>Lasaea miliaris</i>	(Philippi, 1845)	aceptado	Estrecho de Magallanes
	<i>Lasaea nipponica</i>	Keen, 1938	aceptado	Japón
	<i>Lasaea parengaensis</i>	Powell, 1935	aceptado	Nueva Zelanda

Tabla A-1. Continuación.

	Nombre	Autor	Estatus	Distribución citada
Especie	<i>Lasaea petitiana</i>	(Rècluz, 1843)	aceptado	Chile - Argentina
	<i>Lasaea purpurata</i>	Philippi, 1847	aceptado	Tasmania
	<i>Lasaea rubra</i>	Montagu, 1803	aceptado	Costas británicas
	<i>Lasaea souverbiana</i>	Huber, 2015	aceptado	Ar. Nueva Caledonia
	<i>Lasaea subviridis</i>	Dall, 1899	aceptado	E Pacífico
	<i>Lasaea turtoni</i>	Bartsch, 1915	aceptado	Océano Índico
	<i>Lasaea undulata</i>	(Gould, 1861)	aceptado	Japón
	<i>Lasaea mioborealis</i>	Nordsieck, 1972	sin. de <i>Alveinus nitidus</i> (Reuss, 1867) (fósil)	Polonia
	<i>Lasaea neozelanica</i>	Suter, 1913	sin. de <i>Arthritica bifurca</i> (Webster, 1908)	Nueva Zelanda
	<i>Lasaea oblonga</i>	Carpenter, 1857	sin. de <i>Isorobitella trigonalis</i> (Carpenter, 1857)	E Pacífico
	<i>Lasaea reikoeae</i>	Suzuki y Kosuge, 2010	sin. de <i>Arthritica reikoeae</i> Suzuki y Kosuge, 2010	Japón
	<i>Lasaea rietensis</i>	Turton, 1932	sin. de <i>L. turtoni</i> Batsch, 1915	
	<i>Lasaea rossiana</i>	Finlay, 1928	sin. de <i>L. hinemoa</i> Finlay, 1928	
	<i>Lasaea striata</i>	Tokunaga, 1906	sin. de <i>Chavania striata</i> (Tokunaga, 1906)	E Pacífico
	<i>Lasaea trigonalis</i>	Carpenter, 1857	sin. de <i>Isorobitella trigonalis</i> (Carpenter, 1857)	E Pacífico
	<i>Lasaea whitechurchi</i>	Turton, 1932	sin. de <i>L. turtoni</i> Batsch, 1915	

Tabla A-2. Especies del género *Lasaea* citadas para América del Sur bajo diversas denominaciones.

Nombre	Localidad tipo	Citas para América del Sur	Referencia
<i>L. adansoni</i> (Gmelin, 1791)	Senegal, África occidental	Río de la Plata (costa uruguaya) Patagonia; Is. Malvinas; Is. Georgias del Sur; Is. Orcadas Puerto Pirámides (Península de Valdés) Argentina y Chile (desde Península de Valdés y Concepción hasta Canal Beagle) Región magallánica hasta Perú	Scarabino (2003) Zelaya (2005) Pastorino (1994) Forcelli (2000) Carcelles y Williamson (1951)
<i>L. consanguinea</i> (Smith, 1879)	Bahía del Observatorio, Golfo de Morbihan, Is. Kerguelen	Antártica e islas del Arco de Escocia (excepto Is. Georgias del Sur) Is. Malvinas Is. Malvinas; Is. Orcadas	Dias Passos y Magalhães (2011) Melville y Standen (1914) Powell (1951)
<i>L. helenae</i> Soot-Ryen, 1959	Iquique, Chile	Perú, Chile	Soot-Ryen (1959)
<i>L. macrodon</i> (Stempell, 1902)	Ar. Juan Fernández, Chile	Ar. Juan Fernández	Stempell 1902
<i>L. miliaris</i> (Philippi, 1845)	Bahía Eagle, Estrecho de Magallanes	Canal Beagle Región Magallánica; Is. Malvinas; I. Campbell; I. Auckland I. Macquerie; NZ Is. Malvinas	Philippi (1845) Carcelles y Williamson (1951); Dell (1964); Linse (1999) Melville y Standen (1914)
<i>L. petitiana</i> (Rècluz, 1843)	El Callao, Perú	Desde Perú hasta el Estrecho de Magallanes Is. Galápagos; Ar. Juan Fernández Canal Beagle Chile (Región Antofagasta) Argentina y Chile (desde Península de Valdés y Concepción hasta Canal Beagle)	Soot-Ryen (1951), Carcelles y Williamson (1951) Marincovich (1973) Linse (1997) Guzmán <i>et al.</i> (1998) Forcelli (2000)

BIBLIOGRAFÍA CITADA EN EL ANEXO

- Bieler R, Mikkelsen PM. 2006. Bivalvia – a look at the branches. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 223-235.
- Bieler R, Carter JG, Coan EV. 2010. Classification of bivalve families. En: Bouchet P, Rocroi JP (eds.) *Nomenclator of bivalve families*. *Malacologia* 52: 113-184.
- Bouchet P. 2018. WoRMS Editorial Board. 2018. World Register of Marine Species. Disponible en: <http://www.marinespecies.org>
- Brown T. 1827. *Illustrations of the conchology of Great Britain and Ireland: drawn from Nature*. WH and D. Lizars, London. 144 p, 52 lám.
- Brown T. 1833. *The conchologist's textbook: embracing the arrangements of Lamarck and Linnaeus, with a glossary of technical terms*. Glasgow: Fullarton and Company. London. 226 p.
- Carcelles AR, Williamson SI. 1951. Catálogo de los Moluscos Marinos de la Provincia Magallánica. *Revista del Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales, Ciencias Zoológicas Tomo II*. 386 p.
- Dall WH. 1900. Contributions to the tertiary fauna of Florida, Part 5. *Transactions of the Wagner Free Institute of Science of Philadelphia* 3: 949-1218.
- Dias-Passos F, Magalhães FT. 2011. A comparative study of the Bivalvia (Mollusca) from the continental shelves of Antarctica and Brazil. *Biota Neotropical* 11: 143-156.
- Forbes E, Hanley S. 1853. *A history of british Mollusca, and their shells*. Vol. II. Including the remains families of bivalves, the Pteropoda, and Gasteropoda as far as lantthinidae. London. 557 p.
- Forcelli DO. 2000. *Moluscos magallánicos*. Vázquez-Mazzini Ed., Buenos Aires. 200 p.

- Goto R, Kawakita A, Ishikawa H, Hamamura Y, Kato M. 2012. Molecular phylogeny of the bivalve superfamily Galeommatoidea (Heterodonta, Veneroidea) reveals dynamic evolution of symbiotic lifestyle and interphylum host switching. *BMC Evolutionary Biology* 12: 172-185.
- Goto R, Ishikawa H, Hamamura Y. 2016. Morphology, biology, and phylogenetic position of the bivalve *Platomysia rugata* (Heterodonta: Galeommatoidea), a commensal with the sipunculan worm *Sipunculus nudus*. *Zoological science*, 33: 441-447.
- Keen AM. 1938. New pelecypod species of the genera *Lasaea* and *Crassinella*. *Proceedings of the Malacological Society, London* 23: 18-32.
- Linse K. 1997. Die Verbreitung epibenthischer Mollusken im chilenischen Beagle-Kanal. *Berichte zur Polarforschung* 228: 1-131.
- Linse K. 1999. Mollusca of the Magellan region. A checklist of the species and their distribution. *Scientia Marina* 63: 399-407.
- Marincovich L. 1973. Intertidal mollusks of Iquique, Chile. *Natural History Museum Los Angeles County, Science Bulletin* 16: 1-49.
- Melville JC, Standen R. 1914. Notes on Mollusca collected in the north-west Falklands. *The Annals and Magazine of Natural History including Zoology, Botany, and Geology. Eighth Series* 13: 110-113.
- Montagu G. 1803. *Testacea britannica or natural history of british shells, marine, land and fresh-water, including de most minute: systematically arranged and embellished with figures. Part 1, London.* 637 p.
- Ó Foighil D. 1986. Prodissoconch morphology is environmentally modified in the brooding bivalve *Lasaea subviridis*. *Marine Biology* 92: 517-524.
- Ó Foighil D. 1988. Random mating and planktotrophic larval development in the brooding hermaphroditic clam *Lasaea australis* (Lamarck, 1818). *The Veliger* 31): 214-221.

- Ó Foighil D, Eernisse DJ. 1988. Geographically widespread, non-hybridizing, sympatric strains of the hermaphroditic, brooding clam *Lasaea* in the northeastern Pacific Ocean. *The Biological Bulletin* 175: 218-229.
- Ó Foighil D, Thiriou-Quévrecq C. 1999. Sympatric Australian *Lasaea* species (Mollusca: Bivalvia) differ in their ploidy levels, reproductive modes and developmental modes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 127: 477-494.
- Pastorino G. 1994. Moluscos costeros recientes de Puerto Pirámide, Chubut, Argentina. *Miscelánea* 93. Academia Nacional de Ciencias (Córdoba, Argentina). 30 p.
- Philippi RA. 1845. Diagnosen einiger neuen Conchylien. *Archiv Naturgeschichte* 2: 50-71.
- Ponder WF. 1971. Some New Zealand and subantarctic bivalves of the Cyamiacea and Leptonacea with descriptions of new taxa. *Records of the Dominion Museum of New Zealand* 7:119-141.
- Powell AWB. 1951. Antarctic and Subantarctic Mollusca: Pelecypod and Gastropoda. *Discovery Reports* 26: 49-196 (más 10 lám.).
- Rècluz AE. 1843. Monographie du genre *Poronie*. *Revue Zoologique, par la Société Cuvierienne (Paris)* 6: 166-177.
- Scarabino F. 2003. Lista sistemática de los Bivalvia marinos y estuarinos vivientes de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 8: 229-259.
- Smith EA. 1879. Mollusca. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 168: 167-192.
- Soot-Ryen T. 1951. Antarctic pelecypods. *Scientific Results of the Norwegian Antarctic Expeditions 1927-1928*, 32: 1-46.
- Soot-Ryen T. 1959. Reports of the Lund University Chile Expedition 1948-49. 35. Pelecypoda. *Lunds Universitets Arsskrift* 55: 1-86.

- Stempell W. 1902. Die Muscheln der Sammlung Plate. (Systematische Uebersicht), p. 217-249, pl. 12. In Plate L. Fauna Chilensis. Zoologische Jahrbücher Suppl. 5.
- Zelaya DG. 2005. The bivalves from the Scotia Arc islands: species richness and faunistic affinities. *Scientia Marina* 69: 113-122.
- Zelaya DG, Güller M. 2014. Bivalvia, pp 147-161. En: Calcagno JA (ed.) *Los invertebrados marinos*. Editorial Vázquez Mazzini. Buenos Aires.