



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Crecimiento, reproducción y alimentación del ofiuroido
Ophioplocus januarii (Lütken, 1856) (Echinodermata:
Ophiuroidea) en costas de Patagonia, Argentina**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área Ciencias Biológicas

Martín I. Brogger

Director de tesis: Dr. Pablo E. Penchaszadeh
Consejero de estudios: Dr. Pablo E. Penchaszadeh

Lugar de trabajo: Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia".
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2010

Crecimiento, reproducción y alimentación del ofiuroido *Ophioplocus januarii* (Lütken, 1856) (Echinodermata: Ophiuroidea) en costas de Patagonia, Argentina

RESUMEN

Se estudiaron diversos aspectos de la biología del ofiuroido *Ophioplocus januarii* de una población de playa Villarino en el golfo San José (42°24'S; 64°17'O) entre 2005 y 2009. La morfología general del cuerpo y la morfología mandibular se describen a partir de los ejemplares capturados. El desarrollo de la placa dental y la formación de nuevos dientes ocurren tanto en sentido ventral como dorsal, por primera vez descrito para un ofiuroido. El estudio de la musculatura mandibular permite describir y estimar los movimientos de las mandíbulas. La morfometría entre el tamaño del cuerpo y el largo de la placa dental y de los dientes presentan una relación funcional del tipo potencial, siendo posible estimar el tamaño corporal en base a mediciones en las mandíbulas. Los estudios de marcado químico empleando calceína fueron exitosos, quedando evidenciadas las zonas de calcificación mediante una marca fluorescente. Empleando estas técnicas de marcado químico la estructura que mejor indica el crecimiento en esta especie es la mandíbula. Se desarrollaron estudios de crecimiento en campo mediante técnicas de captura, marcado y recaptura, a lo largo de un año de estudio. La tasa de crecimiento K en esta población es $0,222 \text{ año}^{-1}$ y se determinó un largo infinito L_{∞} igual a 20,4

mm de diámetro de disco. La edad máxima fue estimada cercana a los 18 años. Se validó el crecimiento natural de las mandíbulas según lo observado en el análisis morfológico. Contrariamente a lo especulado previamente por otros autores *O. januarii* es una especie micrófaga de alimentación suspensívora, ingiriendo pequeñas partículas en resuspensión en la interfase agua-sedimento. La microestructura del estereoma de sus dientes presenta particularidades que lo diferenciarían de los dientes de especies macrófagas, aún cuando también se diferencia de los de las micrófagas. Se propone un tipo intermedio de arreglo de la matriz dental en ofiuroides. Mediante el análisis de contenidos estomacales y de la microestructura de los dientes, con observaciones de campo, se describe la estrategia alimentaria de esta especie en la zona de estudio. Se trata de una especie omnívora, alimentándose principalmente de fragmentos de algas y tricomas de plantas terrestres, complementando con otros ítems de manera oportunista. *Ophioplocus januarii* se reproduce de manera continua, alejándose del patrón estacional de especies de aguas templadas, pero adoptando a nivel individual un desarrollo cíclico de las gónadas. Se discuten la influencia de los factores endógenos y exógenos que pueden estar regulando la reproducción en esta especie. Las mayores tallas oocitarias registradas son de 400 μm de diámetro, lo que corresponde a un desarrollo lecitotrófico, probablemente mediante una larva vitelaria.

Palabras clave: Echinodermata, Ophiuroidea, morfología mandibular, alimentación, microestructura dental, crecimiento, marcado químico con calceína, reproducción, ciclos reproductivos.

**Growth, reproduction and feeding of the ophiuroid *Ophioplocus januarii*
(Lütken, 1856) (Echinodermata: Ophiuroidea) at Patagonian coasts,
Argentina**

ABSTRACT

Several aspects of the biology of the ophiuroid *Ophioplocus januarii* were studied at a population from Villarino beach at San José gulf (42°24'S; 64°17'W) between 2005 and 2009. The general morphology of body and jaws are described. The dental plate development and new teeth formation occurs both dorsally and ventrally, a fact herein reported for the first time in ophiuroids. Jaw muscles observation allows describing and estimating the jaw movements. The morphometric between body size and dental plate and teeth length follows a power functional relationship, being able to predict body size based on jaws measurement observations. Chemical marking studies using calcein were successful; calcification areas were observed as fluorescent marks. Using this technique, the best structure that represents growth were the jaws. Field growth studies were conducted using capture-marking and recapture, along one year period. The growth constant K for this population was 0.222 yr^{-1} and the infinite

size L_{∞} equal to 20.4 mm disc diameter. The estimated maximum age was 18 years. The natural jaw growth described at the morphological analysis was validated using the chemical growth technique. Opposite to speculations previously made by other authors, *O. januarii* is a microphagous species, ingesting small resuspension particles through suspension feeding from the water-sediment interface. The teeth estereom microstructure presents characteristics that differentiate it from the macrophagous species teeth, yet also differentiated from microphagous ones. A new kind of intermediate arrangement in the dental matrix in ophiuroids is proposed. Based on stomach contents and teeth microstructure analysis, together with field observations, the feeding strategy of this species at the study site is described. It is an omnivorous species, feeding mainly on algae fragments and terrestrial plant trichomes, complemented opportunistically with others items. *Ophioplocus januarii* is a species that breeds continuously, differentiating from the seasonal pattern of other temperate waters species, but adopting at individual level a cyclic gonad development. Exogenous and endogenous factors that may be regulating the breeding in this species are discussed. The maximum oocytes diameter registered are 400 μm , which correspond to a lecithotrophic development, probably through vitellaria larvae.

Keywords: Echinodermata, Ophiuroidea, jaw morphology, feeding, teeth microstructure, growth, calcein chemical marks, reproduction, reproductive cycles.

AGRADECIMIENTOS

La posibilidad de trabajar en un grupo de investigación donde predominan los valores humanos y un generoso profesionalismo hace verdaderamente sencilla la tarea científica. Por ello les estoy eternamente agradecido a todos los integrantes del Laboratorio de Ecosistemas Costeros-Malacología del Museo Argentino de Ciencias Naturales y del Laboratorio de Invertebrados 1 de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A mi director Pablo Penchaszadeh, por seguir brindándome el espacio para desarrollarme profesionalmente, desde ya hace trece años. A mi amigo Penchas, por hacerme formar parte de su gran grupo de afectos y tenerme en cuenta en cada nuevo proyecto, idea o aventura literaria. (¡Por eso te digo!).

Es imposible pensar que el esfuerzo de muestreo y las tareas experimentales en campo necesarias para esta tesis puedan haber sido realizadas sin la ayuda y compañía de muchos amigos: Eugenia Zavattieri, Oscar Wheeler, Gregorio Bigatti, Andrés Averbuj, Soledad Zabala, José Fernández Alfaya, Juan Pablo Livore, María Eugenia Segade, Federico Márquez, Fabián Quiroga, Ricardo “Bebote” Vera y Miguel A. “Hormiga” Díaz. Muchas gracias por las grandes manos que me dieron.

Especialmente quiero agradecer la colaboración desinteresada de Carlos Sánchez Antelo, Sol Rodríguez, Carolina Coulin, Pilar Cadierno y Lorena Arribas, quienes no sólo aportaron su tiempo en el procesamiento de muestras sino que también se interesaron en discutir e indagar conmigo en el mundo de los ofiuroideos.

El análisis de los resultados de morfología se vio notablemente enriquecido gracias a su discusión con Gordon Hendler (Natural History Museum, Estados Unidos) y Sabine Stöhr (Naturhistoriska riksmuseet, Suecia), quienes además, junto a John Lawrence, Maria Byrne, Paulo Sumida, Thomas Brey, Christopher Pomory, John Dearborn y Elizabeth LeClair, facilitaron bibliografía relevante para el desarrollo de los distintos capítulos.

Las imágenes tomadas en microscopio electrónico de barrido fueron posibles gracias a la asistencia de Fabián Tricárico, del servicio de MEB del Museo Argentino de Ciencias Naturales, y a Jaime Groizard, del servicio de MEB de Aluar.

Gracias a todos los colegas y amigos del Centro Nacional Patagónico por haberme abierto las puertas y recibirme como uno más. Un especial agradecimiento a mi amigo Andrés Averbuj por sus sugerencias al borrador de esta tesis y a Pomelo por prestarme su cuarto durante mis viajes a Puerto Madryn.

Mi entusiasmo por el estudio de los equinodermos se vio solamente aumentado y contagiado gracias a largas charlas formales e informales con mis amigos “equinodermólogos”: Mariano Martínez, Tamara Rubilar y Damián Gil. Gracias por compartir el interés en dar a conocer los estudios del grupo en la Argentina.

A todos mis amigos, los biólogos y no biólogos, que estuvieron siempre conmigo cuando necesité despejar la cabeza aunque sea un rato de la tesis.

Quiero agradecer a los jurados por destinar su tiempo, e interesarse en los resultados de mis estudios doctorales. Las observaciones de Graciela Esnal, Laura López Greco y Cristián Ituarte enriquecieron la versión final de esta tesis.

El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas hizo posible el desarrollo del presente trabajo, financiándome con una beca doctoral.

Gracias a mi familia por estar siempre, por el apoyo incondicional y por sumergirse conmigo en la biología marina.

ÍNDICE

1. Introducción.....	01
1.1 Introducción general.....	02
1.2 Posición sistemática de <i>Ophioplocus januarii</i>	06
1.3 Objetivos generales.....	06
2. Metodología general.....	07
2.1 Área de estudio.....	08
2.2 Procesamiento de las muestras.....	10
2.3 Software empleado.....	11
3. Morfología.....	12
3.1 Introducción.....	13
3.2 Metodología.....	18
3.3 Resultados.....	19
3.3.1 Morfología general.....	19
3.3.2 Morfología mandibular.....	26
3.3.3 Relaciones morfométricas.....	32
3.4 Discusión.....	35
4. Alimentación.....	40
4.1 Introducción.....	41
4.2 Metodología.....	43
4.3 Resultados.....	44
4.3.1 Contenidos estomacales.....	44
4.3.2 Observaciones en campo.....	47
4.3.3 Dientes y alimentación.....	48
4.4 Discusión.....	54
5. Crecimiento.....	58
5.1 Introducción.....	59
5.2 Metodología.....	62
5.3 Resultados.....	69
5.3.1 Estudios de laboratorio.....	69

5.3.2 Estudios en campo.....	73
5.3.3 Análisis de datos de crecimiento por incremento de tallas.....	81
5.3.4 Estudios de microscopía electrónica de barrido.....	86
5.4 Discusión.....	88
6. Reproducción.....	93
6.1 Introducción.....	94
6.2 Metodología.....	101
6.3 Resultados.....	104
6.3.1 Índices gonadales.....	104
6.3.2 Análisis histológico y microscopía electrónica de barrido.....	106
6.3.3 Frecuencias de tallas oocitarias.....	114
6.3.4 Correlación con factores ambientales.....	118
6.4 Discusión.....	119
7. Discusión general.....	126
8. Conclusiones finales.....	131
9. Bibliografía.....	133
10. Apéndices.....	150
Apéndice 1: Clasificación de la clase Ophiuroidea.....	151
Apéndice 2: Distribución de tallas oocitarias para cada hembra.....	152

1- INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1 Introducción general

La clase Ophiuroidea es el grupo de equinodermos vivientes más abundante y con mayor número de especies, encontrándolos en todos los tipos de ambientes bentónicos. Poseen típicamente cinco brazos, cada uno de los cuales consiste en una columna de osículos (llamados “vértebras”) articulados entre sí, unidos por músculos y cubiertos por placas (Hyman, 1955).

En la cara oral presentan cinco pares de invaginaciones llamadas bursas que se conectan con el exterior a través de las hendiduras genitales, en la base de los brazos. En estas bursas se encuentran las gónadas, las cuales generalmente liberan sus productos sexuales al medio donde se lleva a cabo la fecundación. En la mayoría de las especies de ofiuroideos el desarrollo ocurre mediante una larva ciliada planctotrófica, mientras que otras son vivíparas e incuban a sus crías en las bursas (Giese *et al.*, 1991). Algunos ofiuroideos se reproducen asexualmente por fisiparí (el fraccionamiento del cuerpo en dos y posterior regeneración de las partes faltantes), siendo la regeneración de los brazos y partes del cuerpo amputadas común en esta clase (Hyman, 1955).

Los ofiuroideos son miembros dominantes en las comunidades bentónicas marinas, exhibiendo un amplio rango de estrategias reproductivas (Hendler, 1991). En muchas de estas comunidades los miembros de este grupo contribuyen significativamente a la diversidad de especies, abundancia y biomasa de la fauna (e.g. Hyman, 1955; Dahm, 1999). En cuanto a su alimentación pueden ser suspensívoros, detritívoros o carnívoros, alimentándose incluso de peces. Algunas especies de ofiuroideos pueden presentarse en densas poblaciones en la epifauna de fondos blandos (Lefebvre

et al., 1999). En el continente antártico se encuentran entre los animales más abundantes de las comunidades bentónicas (Manjón-Cabeza y Ramos, 2003). Son altamente específicos respecto al ambiente, sus historias de vida y mecanismos de alimentación reflejan las particularidades del hábitat (Fell, 1966).

En proporción a la abundancia y diversidad de equinodermos en las costas argentinas se han desarrollado relativamente pocos estudios biológicos (e.g. Penchaszadeh, 1973; Rubilar *et al.*, 2005; Marzinelli *et al.*, 2006; Brogger *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010). Entre ellos no se registran trabajos sobre la clase Ophiuroidea, representando así este grupo una de las clases de equinodermos más desconocidas para la ciencia en la Argentina. Existen unas pocas publicaciones que tratan sobre la distribución y taxonomía de este grupo, realizadas en los 60's por Bernasconi (1965a, b) y Tommasi (1968), y en los 70's por Bernasconi y D'Agostino (1971, 1974, 1975, 1977). Posteriormente Bartsch (1982) estudió muestras bentónicas tomadas de la plataforma continental patagónica, describiendo caracteres externos e internos de once especies de ofiuroides. Los trabajos pioneros de la Dra. Irene Bernasconi sentaron las bases taxonómicas para el Phylum en la Argentina, y sobre ellos se han basado los estudios posteriores.

Ophioplocus januarii (Lütken, 1856) se distribuye aproximadamente desde el golfo Nuevo, Chubut, hasta un dudoso registro en las Antillas, hacia el norte (Bernasconi y D'Agostino, 1971, 1977; Thomas, 1975; Bartsch, 1982) (Fig. 1.1). El registro al norte pareciera corresponder a una mala identificación, por lo cual su distribución estaría limitada al norte de Brasil. Es una especie de ofiuroides bastante común de aguas costeras poco profundas (Zaixso y

Lizarralde, 2000) y se la encuentra tanto en fondos blandos arenosos como en los duros rocosos (Tommasi, 1970). Para esta especie se han realizado estudios químicos en donde se han aislado diversos compuestos orgánicos bioactivos (Roccatagliata *et al.*, 1996; Duque *et al.*, 1997).



Figura 1.1. Imagen del ofiuroido *Ophioplocus januarii* en playa Villarino, golfo San José. Tomada y modificada de ProyectoSub (www.ProyectoSub.com.ar).

Existen trabajos que indican que una especie del mismo género, *Ophioplocus japonicus* se reproduce mediante larvas lecitotróficas que completan su desarrollo en menos de una semana (Komatsu y Shosaku, 1993), y que otra, *Ophioplocus esmarki*, es vivípara e incuba a sus crías en las bursas (Medeiros-Bergen y Ebert, 1995). En esta última especie se han logrado estimar las tasas de crecimiento, fecundidad y mortalidad mediante parámetros obtenidos en ensayos donde se marcó a los individuos con calceína, un

marcador fluorescente de los sitios de calcificación. En otras especies se ha estimado el crecimiento de los individuos mediante el conteo de bandas de diferentes grosores que se observan en los osículos de los brazos, que reflejan distintos pulsos de calcificación en el crecimiento, y que luego fueron relacionadas con el tamaño del disco del cuerpo (Gage, 1990, 2003; Dahm, 1993; Dahm y Brey, 1998).

El estudio de los valores mensuales de la relación porcentual entre el peso de las gónadas y el peso del cuerpo (índice gonadal) a lo largo del tiempo permite establecer las variaciones cíclicas de la reproducción en equinodermos (Giese *et al.*, 1991; Hendler y Tran, 2001). Este índice en conjunto con el análisis histológico permite reconocer las distintas etapas reproductivas, como eventos de liberación de gametas al medio, reposo sexual, crecimiento y reabsorción de las gónadas (Falkner y Byrne, 2003).

La capacidad de regenerar partes del cuerpo varía entre las distintas especies. La pérdida de biomasa por una perturbación física, competencia inter e intraespecífica, o por depredación parcial puede resultar ser letal o sub-letal para un individuo. En el caso de una depredación sub-letal la biomasa es transferida al nivel trófico siguiente sin que exista la muerte de la presa, por lo cual la regeneración también provee un recurso renovable para los niveles tróficos superiores (Pomory y Lawrence, 2001). La posibilidad de un organismo de recuperarse luego de una lesión es esencial para su supervivencia y su futuro éxito reproductivo. Esta recuperación requiere la redistribución de la energía hacia la regeneración, lo cual es adicional a los procesos energéticos normales de mantenimiento, crecimiento y reproducción, y por lo tanto afecta al *fitness* de estos organismos (Pomory y Lawrence, 1999a, b).

Como resultado de la depredación por parte de peces e invertebrados los ofiuroideos pueden perder brazos, o partes de brazos, e incluso porciones del disco central. Se ha registrado que entre el 20% y hasta el 100% de los ofiuroideos en un área determinada pueden encontrarse regenerando partes del cuerpo perdidas (Soong *et al.*, 1997). Los ofiuroideos tienen, a través de la regeneración, el potencial de abastecer con cantidades significativas de biomasa al siguiente nivel trófico, pero raramente han sido considerados a pesar de estar entre los componentes dominantes de las comunidades bentónicas (Gage *et al.*, 2004).

1.2 Posición sistemática de *Ophioplocus januarii*

Clase **Ophiuroidea** Gray, 1840

Orden **Ophiurida** Müller & Troschel, 1840

Suborden **Ophiurina** Müller & Troschel, 1840

Infraorden **Ophiolepidina** Ljungman, 1867

Familia **Ophiolepididae** Ljungman, 1867

Género *Ophioplocus* Lyman, 1862

Ophioplocus januarii (Lütken, 1856)

1.3 Objetivos generales

Estudiar la biología del ofiuroideo *Ophioplocus januarii* del golfo San José, Chubut. Analizar su reproducción, evaluando mecanismos de regulación mediados por factores ambientales, y sus estrategias y hábitos alimentarios. Actualizar los estudios biológicos sobre la fauna marina de la Argentina mediante la aplicación de técnicas experimentales modernas para estudiar el crecimiento y el estudio de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido.

2- METODOLOGÍA GENERAL

2. Metodología general.

2.1 Área de estudio

El sitio de estudio se encuentra dentro del Área Natural Protegida (ANP) en la Península Valdés, en el lado norte del istmo Ameghino, que corresponde al golfo San José, provincia de Chubut. Se tramitaron los permisos correspondientes de muestreo en la Dirección de Fauna – ANP. El golfo San José se encuentra ubicado entre 42°14'S / 42°26'S y 64°04'O / 64°36'O, es de forma aproximadamente rectangular y mide unos 42 Km de este a oeste por 19 Km de norte a sur. Su boca de acceso tiene 6,8 Km de ancho y es el menor en cuanto a superficie de los tres golfos Norpatagónicos. La costa está formada principalmente por gravas, arenas y fragmentos de conchas no consolidados. A la vez se observan afloramientos de roca psamítica y pelítica en barrancas y acantilados, que pertenecen a la Formación Puerto Madryn del Mioceno, contemporánea a la Formación Patagonia del Terciario marino existente en el resto de la Patagonia (Haller *et al.*, 2001).

Los muestreos se realizaron en playa Villarino (Fig. 2.1), en un área de 100 metros de radio alrededor del punto geo-referenciado (42°24'25"S; 64°17'38"O). Se accede a este sitio por buceo autónomo desde embarcaciones semirrígidas con motor fuera de borda, a una profundidad entre 2 y 7 m. Esta playa está compuesta por rodados y arenas gruesas supralitorales y arenas medias a finas en el intermareal. Esta delimitada al oeste por un acantilado activo del Mioceno, perteneciente a la formación Puerto Madryn. Su erosión aporta sedimentos finos al fondo marino somero donde habita *Ophioplocus januarii*. El intercambio de masas de agua en un golfo varía en relación con la amplitud de su boca; el golfo San José posee una entrada muy estrecha, lo que

modifica sustancialmente el intercambio y circulación de las aguas (Fernández *et al.*, 2007).

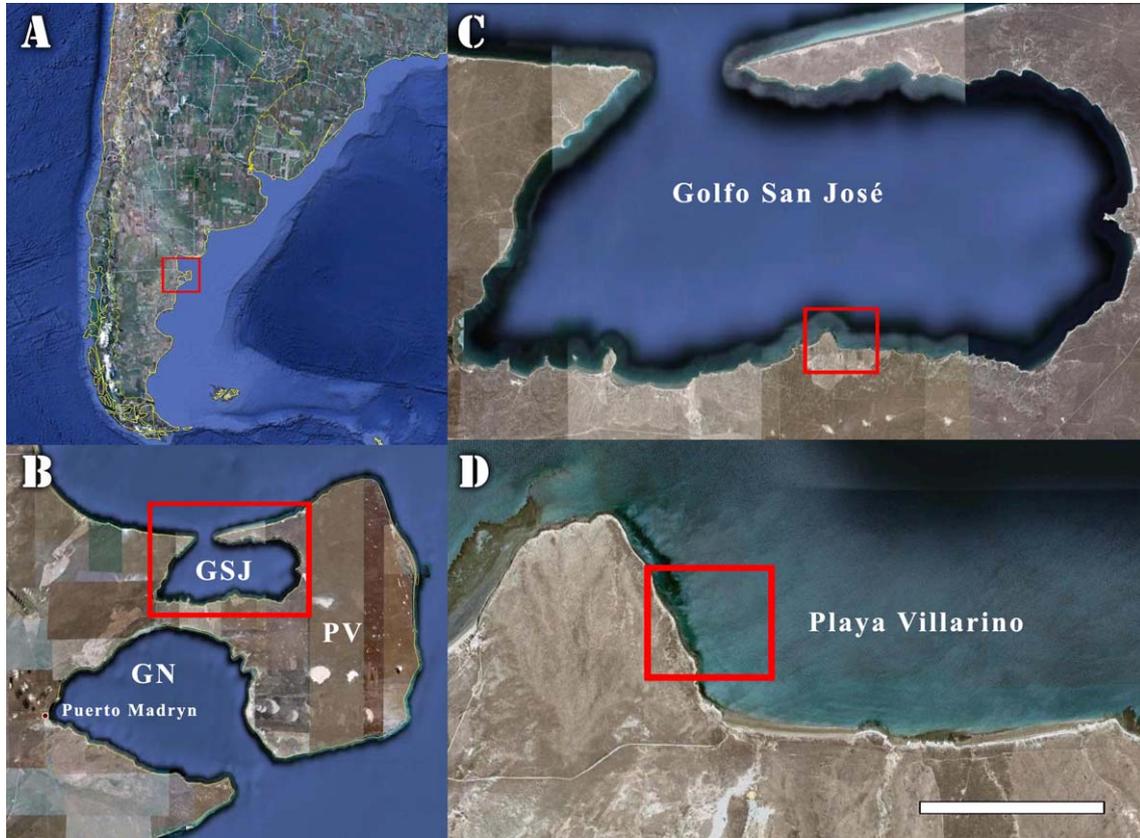


Figura 2.1. Sitio de muestreo. **A-** Localización en Argentina. **B-** Detalle de Península Valdés. **C-** Detalle del golfo San José. **D-** Detalle de playa Villarino, indicando el sitio de estudio. Abreviaturas: GN, Golfo Nuevo; GSJ, Golfo San José; PV, Península Valdés. Barra de escala: D = 1 Km. Imágenes tomadas y modificadas de Google Earth (v. 5.2.1.1588).

El fondo es mixto con afloramientos de roca que disminuyen en cantidad y tamaño al alejarse del acantilado hacia el este. El resto del fondo en el submareal es blando con sedimentos finos y gran cantidad de fracciones de conchas de moluscos, hasta los 20 m de profundidad (Averbuj, 2009).

El régimen de mareas es semidiurno con amplitudes máximas reportadas de hasta 8 m (Amoroso, 2003). La pendiente es muy baja, lo cual determina que la línea de costa se mueva horizontalmente más de 500 m,

mezclando el agua en la zona somera con resuspensión de material particulado. En el golfo San José la temperatura superficial del agua varía anualmente entre 9 y 18 °C (Bigatti, 2005) y el fotoperiodo varía entre 9 y 15 horas de luz.

2.2 Procesamiento de las muestras

Los estudios de morfología, alimentación y reproducción fueron realizados empleando individuos coleccionados mensualmente entre abril de 2005 y abril de 2007, con un total de 25 muestreos consecutivos. Para cada mes se coleccionaron mediante buceo autónomo los primeros 30 individuos encontrados en el mismo punto, a profundidades que oscilaron entre 2 y 7 metros. El acceso al sitio de muestreo fue mediante una embarcación guiada con GPS Garmin® (GPSMAP 76).

Los ejemplares capturados en cada mes fueron colocados *in situ* en bolsas plásticas con cierre hermético, luego fueron fijados en solución de Bouin durante 24 horas y preservados en etanol 70% hasta su procesamiento. En aquellos casos que se observaron partículas remanentes en las bolsas de colección, las mismas fueron preservadas en etanol 70% para su posterior observación bajo microscopio estereoscópico.

A partir de enero de 2006 se registró la temperatura del agua mediante un dispositivo de registro de temperatura (termistor, HOBO®). El mismo fue ubicado en la zona de muestreo fijado al fondo mediante una estaca de hierro y se registraron los valores de temperatura cada 6 horas a una distancia de 50 centímetros del fondo. Para el año 2005 se emplearon las temperaturas superficiales del agua registradas mediante imágenes satelitales para el sitio de

muestreo (provisto por la Red ANTARES: <http://www.antares.ws>), promediando los valores diarios disponibles en cada mes.

Las imágenes en campo fueron tomadas con cámara digital provista de estuche estanco, las observaciones bajo lupa empleando lupas estereoscópicas Zeiss® y Leica®, y las observaciones bajo microscopio empleando un microscopio Zeiss Axio Imager® Z1. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Zeiss AxioCam® HRc, anexa al microscopio, y las mediciones se realizaron de las imágenes tomadas usando el paquete de software Zeiss Axiovision® v.4.4.

Para cada individuo estudiado se registró el diámetro mayor del disco, el largo del brazo mayor y el peso húmedo del animal completo. Entre 10 y 20 individuos de cada mes fueron disecados bajo lupa, siendo separados el estómago y las gónadas. Estas últimas fueron pesadas con el fin de calcular el índice gonadal:

$$IG = (\text{peso de las gónadas} / \text{peso del cuerpo}) * 100$$

Las medidas fueron registradas empleando un calibre vernier de precisión 0,1 mm y los pesos mediante balanza Mettler de precisión 0,1 mg.

2.3 Software empleado

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el software Statistica 6.0, los gráficos fueron construidos empleando Microsoft Excel y FiSAT II, las mediciones de las estructuras se realizaron sobre las imágenes tomadas bajo microscopio y lupa usando el paquete de software Axiovision v.4.4 y las imágenes fueron editadas mediante Adobe Photoshop CS3.

3- MORFOLOGÍA

3. Morfología.

3.1 Introducción

El cuerpo de los ofiuroides se diferencia claramente en un disco central y los brazos. El cuerpo se encuentra protegido por series de osículos cubiertos por tegumento llamados escudos, placas, escamas, espinas y gránulos (Fig. 3.1 A). Pequeños pies ambulacrales emergen por debajo de cada unión de los brazos. Algunas especies emplean los pies ambulacrales en la locomoción, pero la mayoría se mueve mediante el trabajo muscular de un par de brazos que se flexionan y extienden para empujar el disco hacia delante. Las propiedades adhesivas de los pies ambulacrales le permiten a ciertas especies escalar superficies verticales lisas y también capturar y manipular partículas de alimento (Hendler *et al.*, 1995).

Dentro del disco se encuentra un espacioso estómago, una serie de gónadas y unos espacios de forma de sacos llamados bursas. Estas últimas estructuras, que se abren al exterior a los lados de la base de los brazos, cumplen funciones en la respiración y en la reproducción (Fig. 3.1 B). En muchas especies se evidencian escudos radiales pares en la parte dorsal del disco, localizados cerca de la base de los brazos. Estructuras conspicuas por debajo del disco incluyen cinco escudos orales, de los cuales al menos uno es más grande y perforado constituyendo el madreporito (Hyman, 1955; Hendler, 1991).

Página siguiente: **Figura 3.1.** Anatomía general de un ofiuoideo. **A-** 1, Vista dorsal del disco y detalle del brazo. 2, Vista ventral del disco, detalle del brazo y detalle de la mandíbula. **B-** Esquema de la sección vertical del disco. Abreviaturas: b, bursa; d, dientes; e, estómago; g, gónadas; hb, hendidura de la bursa; m, mandíbula; pb, pie bucal; v, vértebra del brazo. A: Tomado y modificado de Hendler *et al.* (1995); B: Tomado y modificado de Hyman (1955).

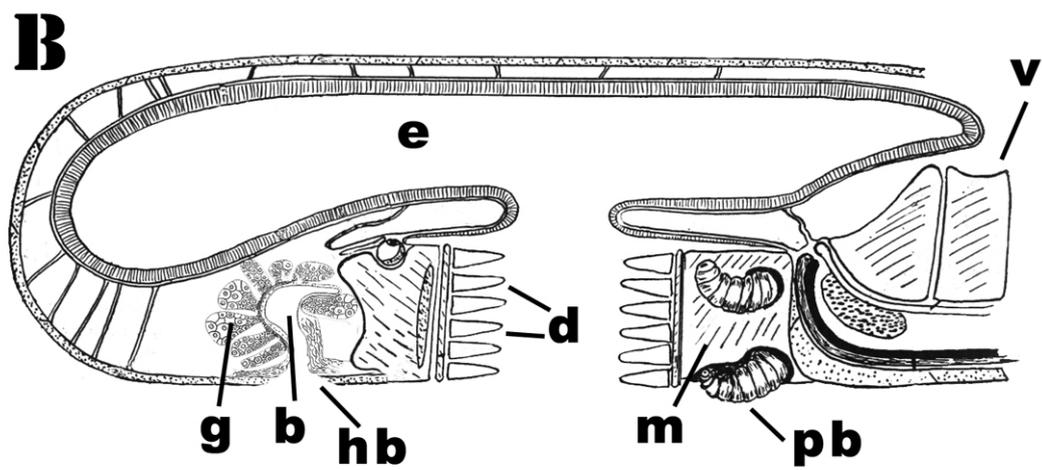
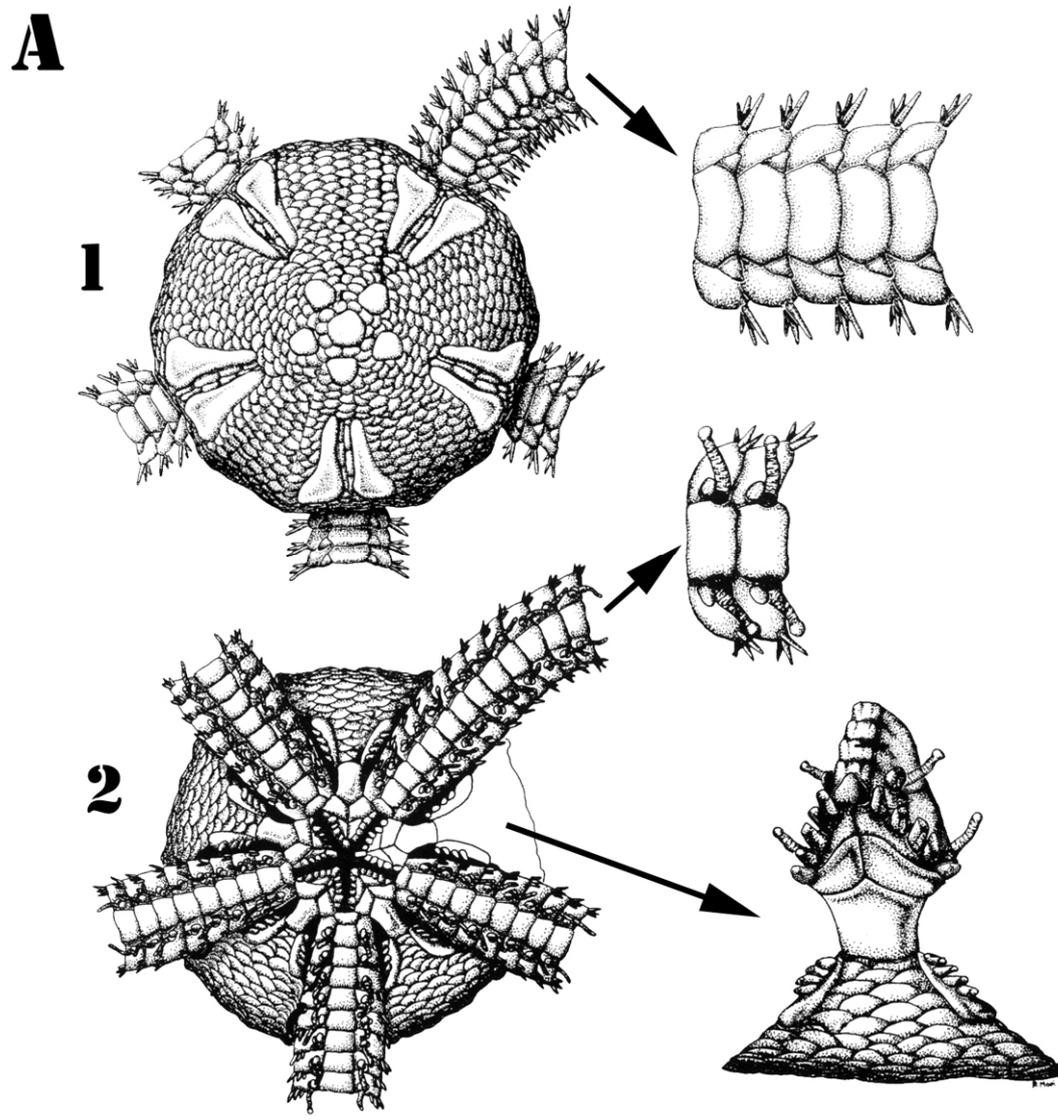


Figura 3.1.

Los brazos están compuestos por series de osículos vinculados por uniones flexibles, y la mayoría de las especies son capaces en cierto grado de realizar movimientos en el plano vertical e incluso algunas pueden enrollarlos. En el centro de los brazos se encuentran las vértebras, que son osículos de forma parecida a las vértebras de la columna vertebral de los vertebrados, unidos por musculatura y tejidos conectivos (Litvinova, 1994). Debajo del disco y formando un anillo se encuentran osículos del brazo modificados, que forman cinco mandíbulas triangulares que enmarcan la localización central de la boca. Adjuntos a las mandíbulas se encuentran otros osículos llamados papilas orales, papilas dentales y dientes. A los lados de los brazos y desde el borde del disco se ubican las placas laterales que protegen los brazos, las cuales soportan series de espinas; las uniones se encuentran cubiertas por encima y por debajo mediante las placas dorsales y ventrales de los brazos. Las espinas de los brazos pueden ser prominentes o inconspicuas, y junto a otras estructuras cumplen funciones en la alimentación y en la defensa (Mashanov *et al.*, 2007).

En los ofiuroideos las placas ambulacrales están fusionadas de a pares formando las vértebras; el surco ambulacral se encuentra transformado en un canal epineural interno (LeClair y LaBarbera, 1997). Esta es una de las características que distingue a los ofiuroideos actuales de los asteroideos (estrellas de mar), presentándose en los últimos un surco ambulacral abierto. Existen dos tipos de vértebras que determinan el tipo de movimiento de los brazos. Esta división tiene gran valor taxonómico en la sistemática del grupo (LeClair, 1994, 1996):

1) Brazos largos y flexibles que pueden plegarse verticalmente; las vértebras presentan uniones del tipo *streptospondylous*. Características del Orden Euryalida. Las caras distales y proximales de las vértebras presentan uniones a modo de proyecciones en forma de reloj de arena perpendiculares.

2) Brazos con movimientos serpentiformes horizontales; las vértebras presentan uniones del tipo *zygospondylous*. Características del Orden Ophiurida (excepto Hemieuryalidae). Las caras distales presentan proyecciones centrales, mientras que las proximales presentan depresiones centrales donde articulan las primeras.

Existen pocos trabajos donde se realice un estudio de la morfología de las mandíbulas de los ofiuroides. El trabajo quizás más detallado a la fecha ha sido el de Murakami (1963) quien analiza las características anatómicas de las placas dentales y orales de varias especies. De sus observaciones infiere la relación existente de los distintos taxones, dando soporte a la clasificación de la clase propuesta por Matsumoto (1915) (y conservada por Spencer y Wright, 1966). Si bien hoy en día esta clasificación ha sido rechazada (e.g., el orden Phrynophiurida no es monofilético) y la clasificación aceptada es la propuesta por Smith *et al.* (1995) (detallada en el "Apéndice 1"), es claro que el análisis morfológico de las mandíbulas, junto a otros caracteres, tiene relevancia en la resolución de la filogenia del grupo.

A continuación se detalla la morfología de la mandíbula de Ophiuroidea, basada en las descripciones de Clark (1914), Spencer (1925), Hyman (1955), Murakami (1963), Hendler *et al.* (1995), Medeiros-Bergen (1996) y Stöhr y Muths (2010):

Placa dental. También llamada placa mandibular o *torus angularis* en publicaciones más antiguas. Esta placa se encuentra próxima al par de placas orales y soporta los dientes y las papilas dentales a los lados del extremo ventral. Cuando se la desprende de la mandíbula se la ve como una placa alta y plana, siendo entera o dividida en varias porciones por fisuras transversales. En la superficie adoral a veces hay una serie vertical de depresiones anchas o redondeadas a lo largo de la línea media, mientras que otras veces la placa presenta proyecciones pequeñas y redondeadas, dispersas por toda la placa o concentradas en el área ventral. Además de las anteriores, a menudo se pueden observar una serie vertical de forámenes en la porción superior, que pueden ser enteros o divididos lateralmente en dos mitades mediante una barra media vertical. En estas depresiones, forámenes y proyecciones, se insertan los dientes o las papilas dentales que yacen proximales a la placa.

Placa oral. Se trata de una placa grande y robusta, colindante a la apertura de la boca. Hay 5 pares de estas placas, conectadas entre si para formar un armazón oral firme. La placa oral da soporte interr radialmente a la placa dental en su borde proximal, donde se une a la placa oral asociada del par, y cada placa articula radialmente en su extremo distal con la primera vértebra de los brazos, junto al extremo de la placa oral del par vecino. Si la placa es vista desde el lado abradial pareciera ser irregularmente cuadrangular. Cada placa oral en realidad se conforma por dos piezas osiculares fusionadas, cuya sutura suele ser inconspicua, y usualmente mantienen la unidad aún luego de tratamientos con hipoclorito de sodio.

Objetivos específicos

Describir la morfología general del cuerpo de *Ophioplocus januarii*.

Describir la morfología mandibular y musculatura asociada.

Identificar variaciones en el número de dientes y evaluar cómo ocurre el incremento de los mismos en el tiempo.

Analizar relaciones de morfometría entre las estructuras mandibulares y el tamaño de los individuos.

3.2 Metodología

Los ejemplares analizados para los estudios morfológicos provienen de los muestreos según lo indicado en la sección "Metodología general". Se emplearon las mandíbulas disecadas de 165 individuos para estudiar las relaciones morfométricas entre el diámetro del disco y las partes mandibulares. De cada animal se extrajeron al azar dos de las 5 mandíbulas, las cuales fueron montadas en vista lateral en portaobjetos mediante adhesivo instantáneo y luego fotografiadas en microscopio estereoscópico Zeiss Stemi 2000-C mediante una cámara digital SoundVision SV-micro. Para cada mandíbula se contó el número de dientes presentes y se realizaron las mediciones de las partes mandibulares sobre las imágenes obtenidas, empleando el software AxioVision, midiéndose el largo de la placa dental y la longitud de los primeros seis dientes en secuencia dorso-ventral.

La morfología general del cuerpo y la morfología mandibular (partes duras y musculatura asociada) fueron descritas en base a disecciones realizadas bajo microscopio estereoscópico y a preparados de microscopía electrónica de barrido (MEB). Los osículos se trataron previamente con una solución diluida de hipoclorito de sodio comercial.

La interpretación de la acción de los músculos de la mandíbula se realizó según movimientos forzados mediante pinzas sobre las partes mandibulares bajo microscopio estereoscópico y mediante diferentes posiciones relativas observadas en las mandíbulas, y musculatura asociada, en los ejemplares preservados.

La nomenclatura empleada para designar la posición relativa de los dientes en la mandíbula es utilizada por primera vez en esta tesis. Se basa en las observaciones realizadas y en la necesidad de nombrar los distintos elementos dentales según su disposición en el eje aboral-oral.

Las relaciones morfométricas entre las partes mandibulares y el tamaño de los individuos fueron analizadas mediante regresiones empleando planillas de cálculo de Excel.

3.3 Resultados

3.3.1 Morfología general

El disco es circular, cubierto totalmente por escamas irregulares, gruesas, grandes. Dorsalmente se distinguen una placa centrodorsal circular o a veces algo pentagonal, una serie de placas algo mayores en la línea media interr radial y otra muy irregular en la línea media radial (Fig. 3.2 A). Escudos radiales ovalados muy separados por una escama mayor ovalada transversalmente y otras muy pequeñas en la escotadura distal (Fig. 3.2 B). Al ser disecados se observa que los escudos radiales sólo exponen externamente aproximadamente la mitad de su superficie, quedando el resto oculta por las escamas circundantes (Fig. 3.2 C). Ventralmente los interr radiales se encuentran totalmente cubiertos por escamas pequeñas. Las hendiduras genitales son

angostas, presentan escamas muy pequeñas abradiales, y se extienden hasta casi el borde del disco (Fig. 3.2 D). Escudos orales ovalados transversalmente, con un pequeño lóbulo proximal y uno más pronunciado distalmente, presentando todos ángulos redondeados. Escudos adorales alargados, algo separados en la línea media interr radial y con el borde distal ensanchado separando al escudo oral de la primera placa ventral de los brazos. Bordeando los escudos adorales y el extremo ventral expuesto de la placa oral se hallan 8-10 papilas orales dispuestas en serie continua; las dos proximales son alargadas y se apoyan parcialmente en la placa dental, las siguientes son gruesas y cuadrangulares, y las distales son triangulares aguzadas, profundizadas en las hendiduras orales (Fig. 3.2 E). No se observan papilas dentales ni infradentales.

Página siguiente: **Figura 3.2.** Morfología externa del disco de *Ophioplocus januarii*. **A-** Vista dorsal del disco. **B-** Detalle de A, dónde se puede observar la posición de los escudos radiales. **C-** Escudos radiales al MEB. La parte más clara es el área expuesta de los escudos mientras que la más oscura es el área oculta, la cual presenta una serie de orificios concéntricos. **D-** Vista ventral de un sector del disco. Se marcan las hendiduras genitales y los cinco escudos orales, de los cuales el más oscuro representa el madreporito (superior izquierdo en la imagen). **E-** Detalle de D al MEB. Se señala el escudo oral, el par de escudos adorales y los cinco pares de papilas orales. Abreviaturas: ae, área expuesta del escudo radial; ao, área oculta del escudo radial; ea, escudo adoral; eo, escudo oral; er, escudo radial; hg, hendidura genital; pc, placa centrodorsal; po, papila oral. Barras de escala: A, B y D =5 mm; C =1 mm; E =100 μ m.

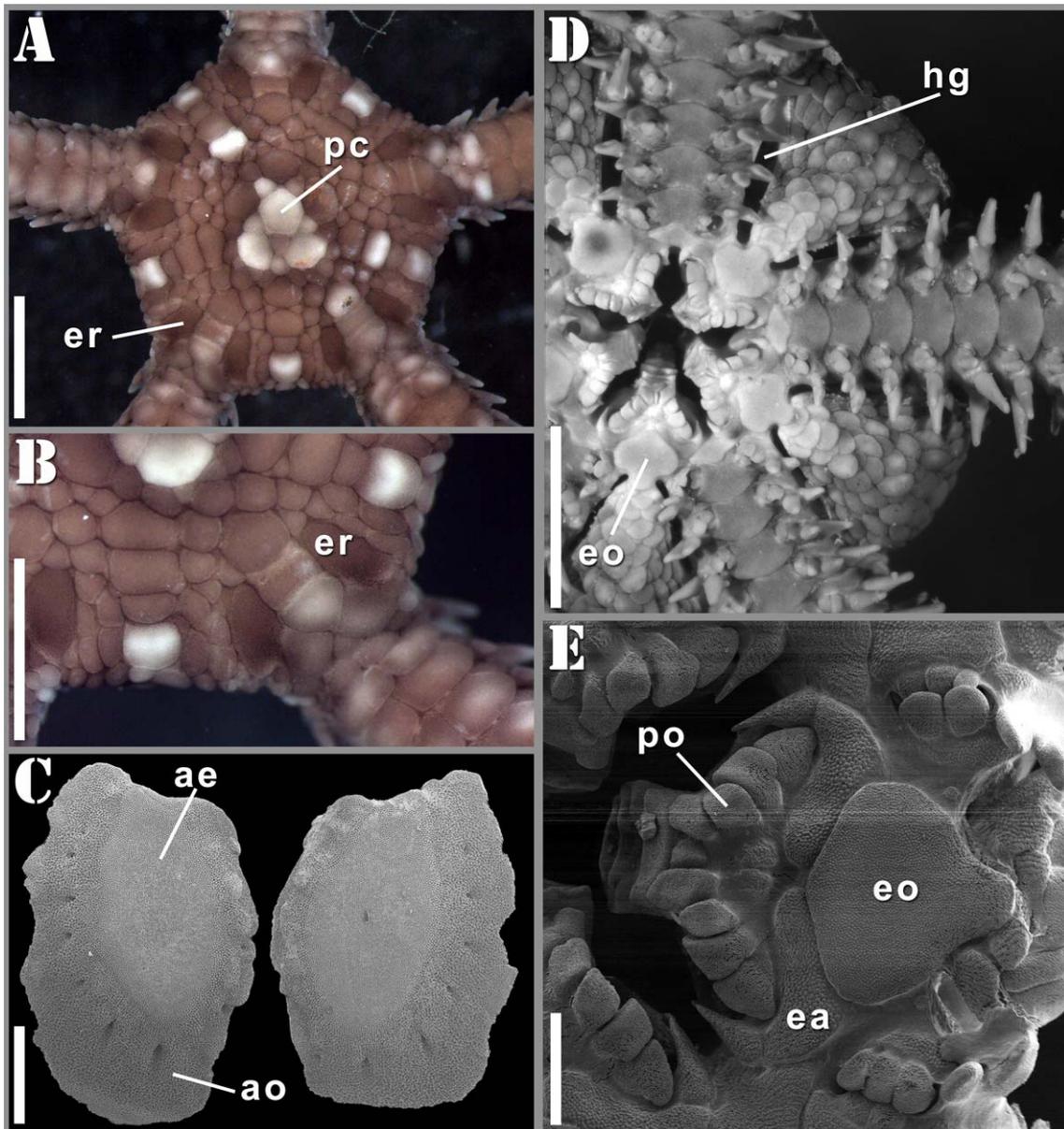


Figura 3.2.

Los brazos de *Ophioplocus januarii* tienen la estructura articulada típica de los miembros del orden Ophiurida. En la parte central de cada segmento se encuentra un osículo vertebral discoidal, producto de la fusión de dos osículos o placas ambulacrales, el cual forma el núcleo del esqueleto interno calcáreo. Cada una de estas vértebras se encuentra rodeada de una placa ventral (Fig. 3.3 B), dos placas laterales y dos placas dorsales (Fig. 3.3 A). La placa ventral

presenta forma pentagonal con una mayor curvatura en los laterales que conforman el borde interno de los poros ambulacrales (Fig. 3.3 F). Las placas laterales portan tres y a veces cuatro espinas, la dorsal más grande, por debajo de las cuales se encuentran los pies ambulacrales (Fig. 3.3 C). Cada placa lateral es curva, con tres articulaciones para las espinas formadas cada una por dos bordes paralelos y dos orificios entre ellos para musculatura y sistema nervioso (Fig. 3.3 E). Las placas dorsales se encuentran fracturadas en 2 partes, a veces algunas en 3 y muy raramente en más partes. Cada placa dorsal es ovalada, más larga que ancha (Fig. 3.3 D). En cada poro ambulacral se encuentran dos o tres escamas braquiales, por lo general dos proximales y una distal, que no cubren el poro (Fig. 3.3 C).

Página siguiente: **Figura 3.3.** Morfología de los brazos de *Ophioplocus januarii*. Todas con extremo distal hacia arriba (excepto E). **A-** Vista dorsal de un sector de un brazo. **B-** Vista ventral de un sector de un brazo. **C-** Detalle de B, se observa el pie ambulacral rodeado de las placas braquiales. **D-** Vista dorsal una serie continua de placas dorsales al MEB. **E-** Placas laterales al MEB (dorsal hacia arriba). 1, Vista de la cara interna (orientación distal a la izquierda). 2, Vista distal. 3, Vista de la cara externa (extremo distal a la derecha). **F-** Vista ventral de una placa ventral al MEB. Abreviaturas: e, espina; pa, pie ambulacral; pd, placa dorsal; pv, placa ventral. Barras de escala: A y B =2mm; D y E =1 mm; F =500 μ m; D =300 μ m.

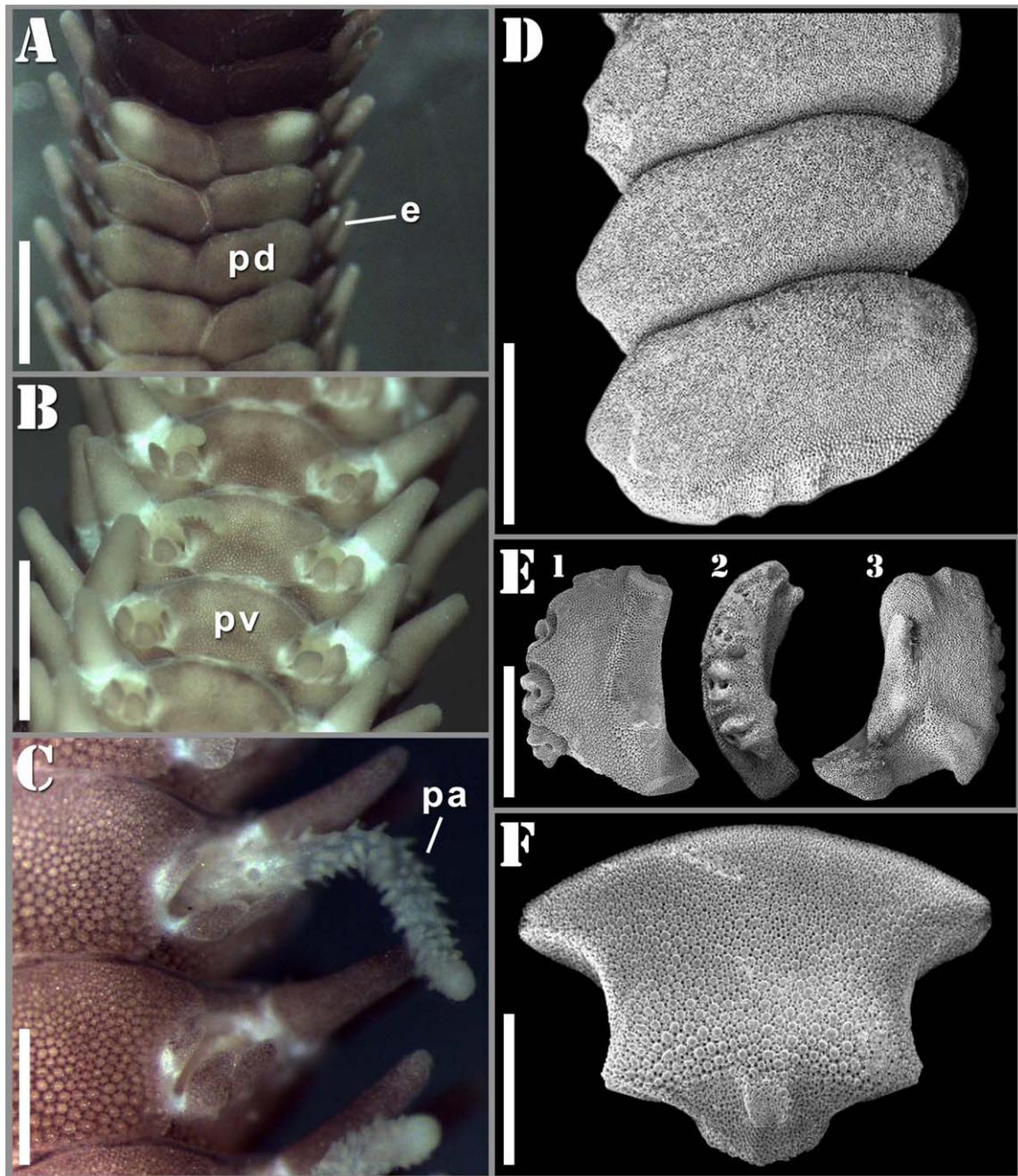


Figura 3.3.

Las superficies articulares de las vértebras presentan un complejo de procesos medio-laterales y depresiones (Fig. 3.4 A). Los procesos aborales y medio de la cara distal de una vértebra articulan con los procesos orales y aboral de la cara proximal de la siguiente. Los osículos vertebrales de segmentos adyacentes se encuentran conectados entre sí mediante un par de

músculos aborales, un par de músculos orales y ligamento intervertebral, conformando la articulación del tipo *zygospondylous* (Fig. 3.4). Un par de pies ambulacrales se localizan en la superficie ventral de cada segmento vertebral (Fig. 3.4 D). Dorsalmente se aprecia el surco aboral en forma de “V”. Ventralmente se forma el canal epineural por el cual corren el sistema ambulacral y el nervio radial, que se proyectan en cada segmento a través del canal del nervio lateral y el canal lateral hacia los pies ambulacrales y espinas (Fig. 3.4 D). La línea de sutura entre ambos osículos ambulacrales que forman cada vértebra se puede observar tanto dorsal como ventralmente.

Página siguiente: **Figura 3.4.** Morfología de las vértebras de *Ophioplocus januarii* al MEB. **A-** Superficies distal (arriba) y proximal (abajo) de los osículos vertebrales (dorsal hacia arriba). **B-** Vista lateral de una unión entre dos vértebras (dorsal hacia arriba). **C-** Vista dorsal de la unión entre dos vértebras. **D-** Vista ventral de la unión de las vértebras. Abreviaturas: a, pie ambulacral; ama, área de musculatura aboral; amo, área de musculatura oral; ce, canal epineural; cl, canal lateral; d, distal; nl, canal del nervio lateral; p, proximal; pa, proceso aboral; po, proceso oral; sa, surco aboral. Barras de escala: todas =500 µm.

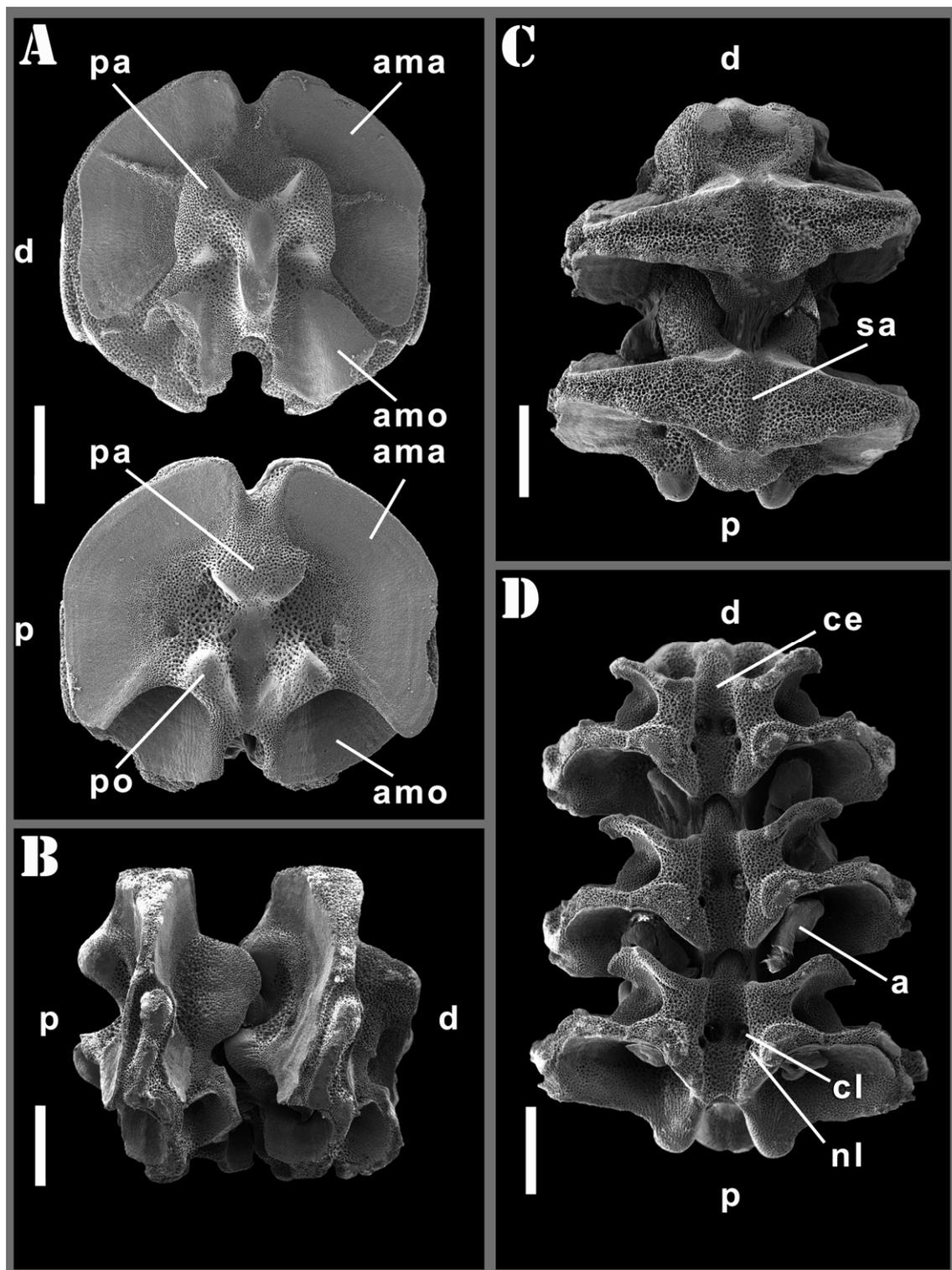


Figura 3.4.

3.3.2 Morfología mandibular

Las mandíbulas están compuestas por dos placas orales (Fig. 3.5), una placa dental (Fig. 3.6) y una serie de dientes planos y rectangulares, conectados a las placas orales por medio de depresiones de distintos tamaños a lo largo de la línea media, a veces presentándose forámenes que atraviesan la placa dental (Fig. 3.6 A y B).

Las placas orales son más altas que anchas, presentan forma de ala (Fig. 3.5 C) y articulan entre sí en un complejo borde adradial recto y con estrías transversales (Fig. 3.5 C1). Cada placa oral está compuesta por dos osículos, con una parte proximal y otra distal unidas mediante una línea de sutura inconspicua que no se quiebra luego del tratamiento con hipoclorito de sodio (Fig. 3.5 C3). En la cara abradial de la porción distal de la placa oral se observa una amplia área muscular en forma de “oreja” (Fig. 3.5 C2). Dorsalmente existe un profundo surco sobre el cual se ubica el anillo nervioso. Cada placa oral presenta dos orificios en la parte proximal de la cara adradial correspondientes a los poros de los pies bucales.

Página siguiente: **Figura 3.5.** Morfología de las placas orales de *Ophioplocus januarii*. **A-** Vista proximal de cuatro placas orales. Al centro se ve la unión abradial de dos de ellas. **B-** Detalle de A, dónde se pueden apreciar tanto la unión abradial como la adradial. **C-** Placa oral. 1, Vista adradial. 2, Vista abradial; la flecha negra indica la sutura. 3, Detalle de la sutura de las dos mitades que forman la placa oral. **D-** Vista dorsal de dos placas orales en unión adradial. **E-** Igual que D, en vista distal. **F-** Igual que D, en vista proximal. Barras de escala: todas =1 mm, excepto C3 =100 µm.

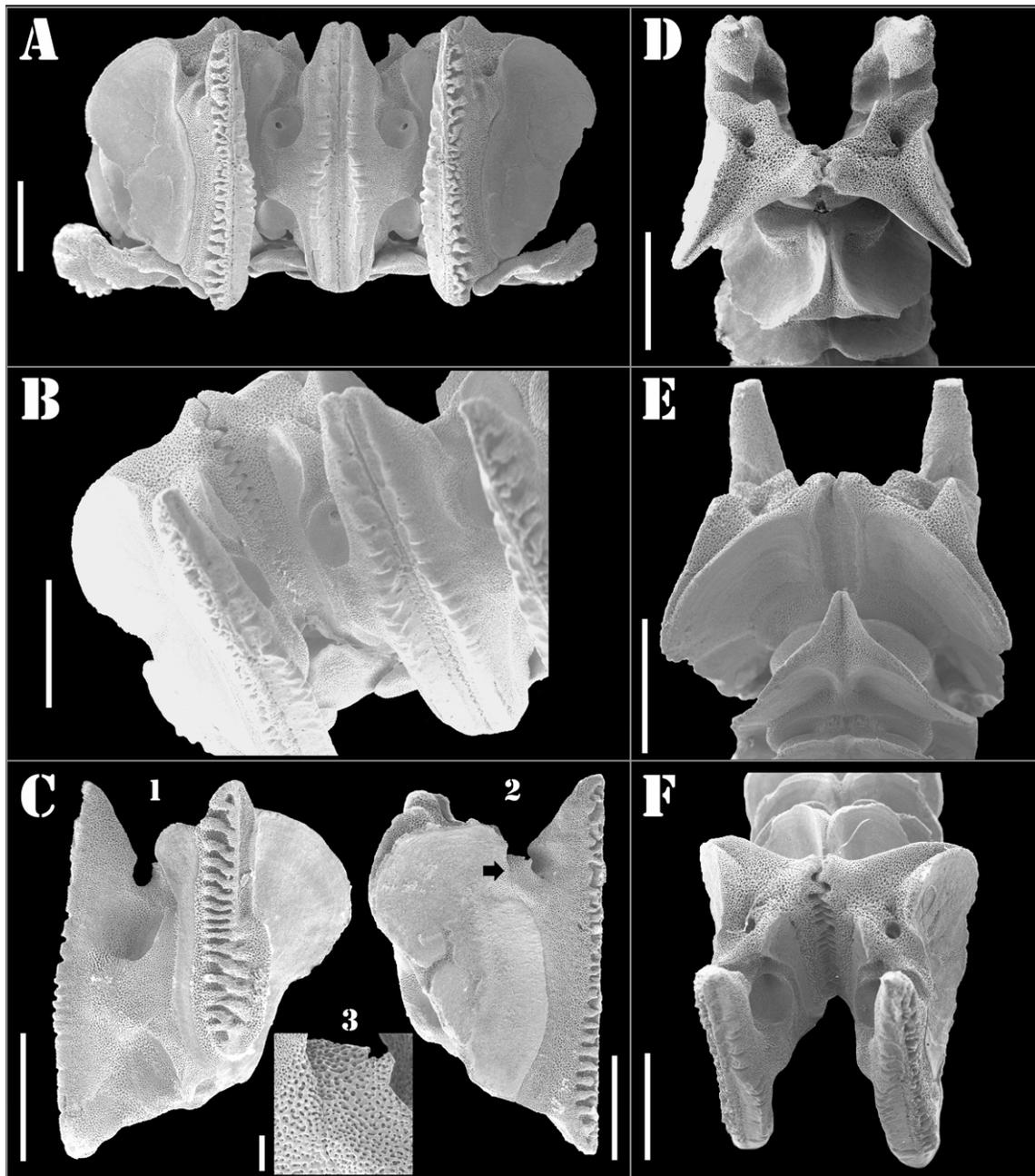


Figura 3.5.

En un ejemplar de 15 mm de diámetro de disco la placa dental es elongada, más de 3 veces más larga que ancha (Fig. 3.6 A y B). El extremo dorsal es trunco, excepto cuando está presente un pequeño diente y se presenta redondeado; el extremo ventral es más redondeado, a veces ligeramente puntiagudo. En la cara proximal se observan unas diez depresiones, siendo las primeras 4 ó 5 fenestradas y divididas por un tabique

medio. En la cara distal se puede apreciar una serie de estrías transversales en la mitad inferior de la placa dental. En un individuo de 8 mm de diámetro las proporciones de la placa dental se mantienen, existiendo sólo 7 depresiones, de las cuales las 3 primeras claramente fenestradas (Fig. 3.6 E).

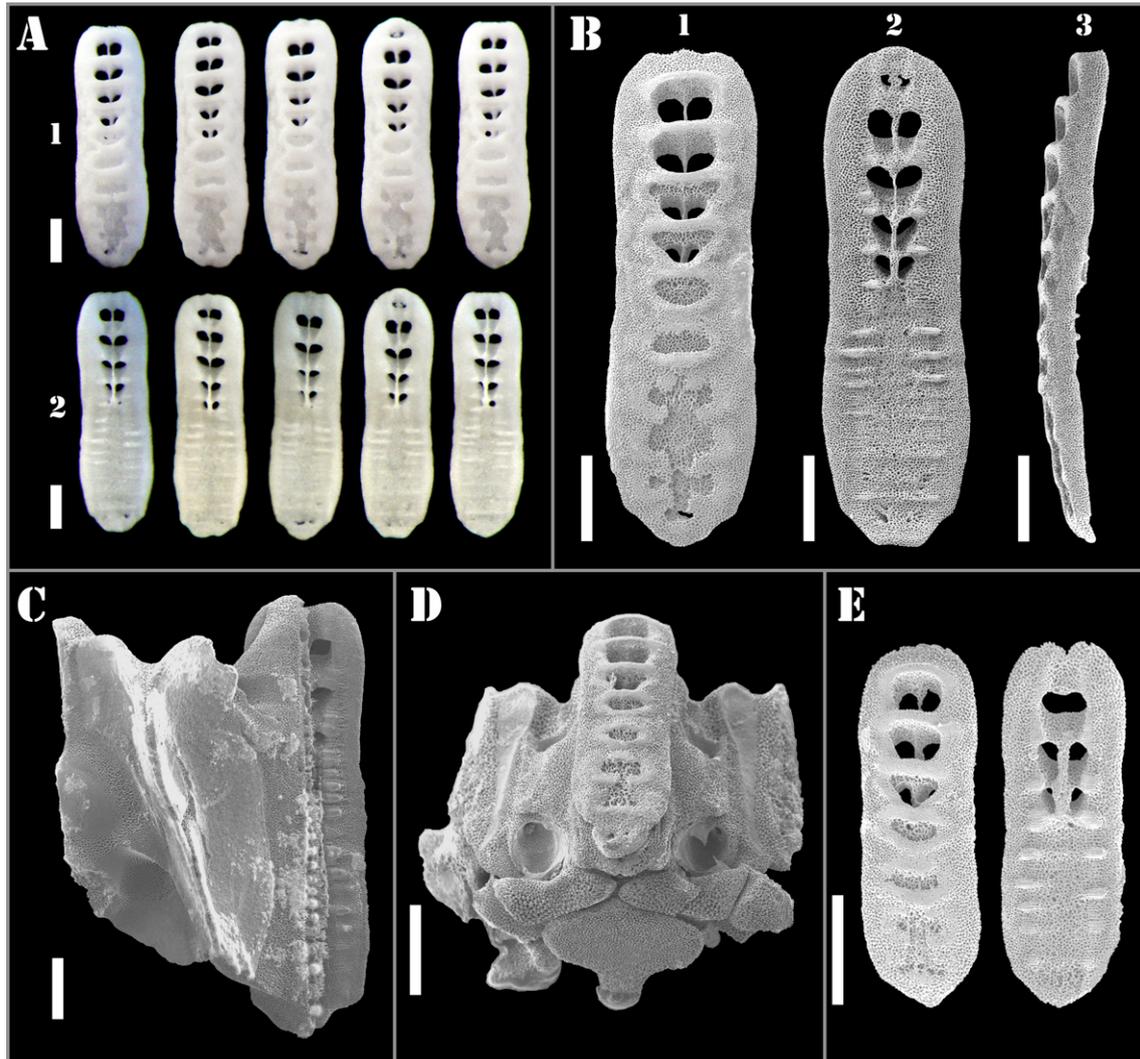


Figura 3.6. Morfología de las placas dentales de *Ophioplocus januarii*. **A-** Las cinco placas dentales de un individuo de 15 mm de diámetro de disco. 1, Vista proximal. 2, Vista distal. **B-** Placas dentales al MEB. 1, Vista proximal. 2, Vista distal. 3, Vista lateral. **C-** Relación entre una placa oral y la placa dental en vista distal. **D-** Vista ventral-proximal de una placa dental soportada por el par de placas orales. **E-** Vista proximal y distal de dos placas dentales de un individuo de 8 mm de diámetro de disco. Barras de escala: todas =500 µm.

Los dientes dorsales son más angostos y largos que los ventrales (Fig. 3.7 A), están insertos en forámenes grandes y tabicados. Los dientes ventrales, en cambio, presentan mayor grosor y menor longitud, están insertos en depresiones con forámenes muy reducidos o ausentes. En un mismo individuo el número de dientes de las cinco mandíbulas es constante, con la excepción de la presencia de un pequeño diente dorsal más chico y corto en alguna de las mandíbulas (Fig. 3.7 A). En estos casos se considera aquí al pequeño diente con el nombre de “diente 0”, continuando la numeración progresiva en sentido dorsal-ventral. Las diferencias en forma de los dientes dorsales y ventrales, además de las diferencias en las depresiones de la placa dental serían resultado de un incremento de dientes dorsal y ventral por separado. Esto se evidencia por la existencia de dientes 0 y dientes ventrales en desarrollo.

Página siguiente: **Figura 3.7.** Mandíbula de *Ophioplocus januarii*. **A-** Disposición de los dientes en la mandíbula. 1, Vista lateral. 2, Vista proximal. Los dientes se encuentran nombrados según la nomenclatura propuesta. **B-** Vista proximal de la mandíbula luego de remover los dientes. 1, Placa dental sobre el par de placas orales. 2, La placa dental separada (fracturada a un costado en su parte inferior). 3, La unión abradial del par de placas orales (se observan los músculos internos interradales de la articulación abradial). Barras de escala: todas =1 mm.

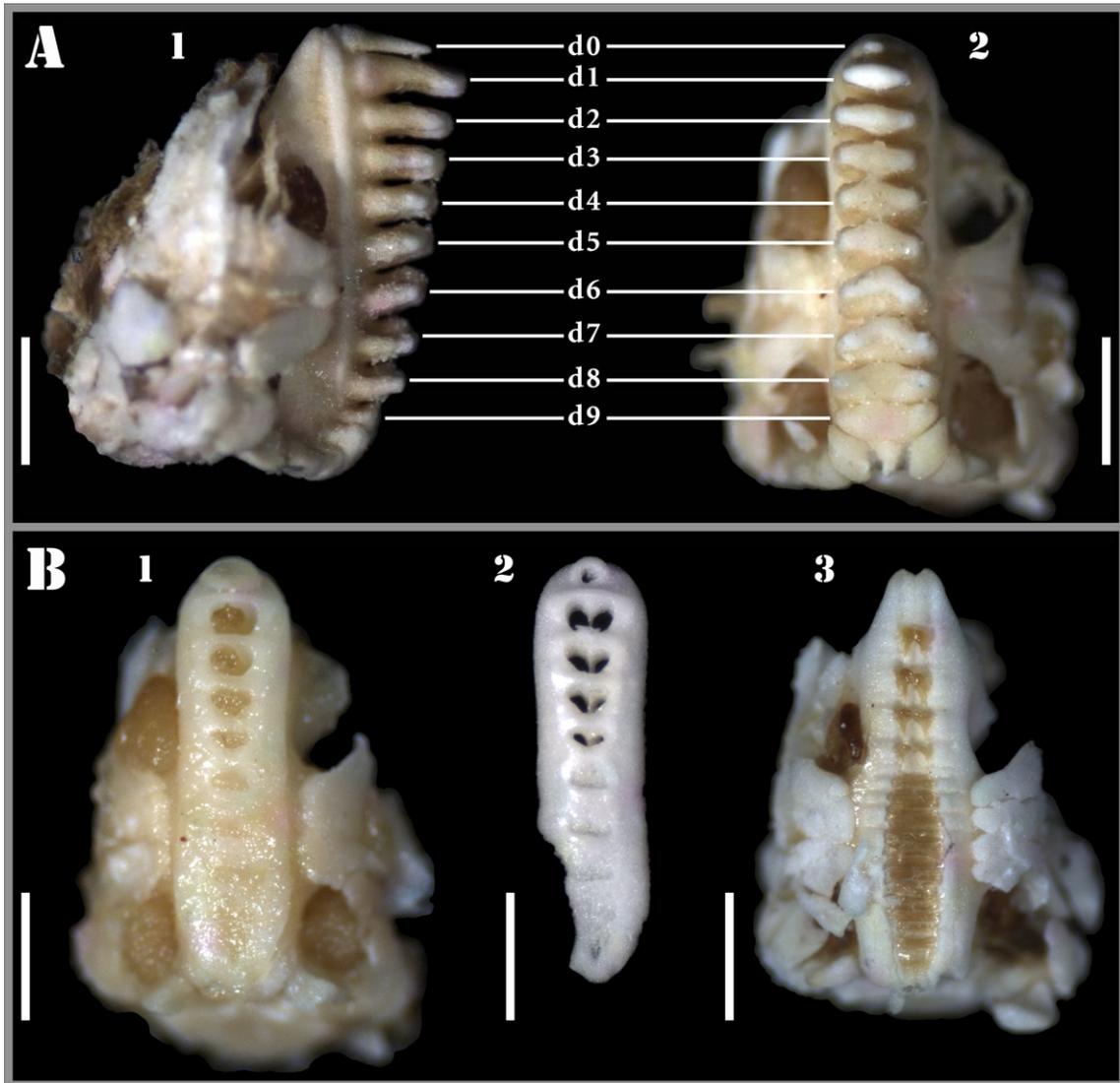


Figura 3.7.

Luego de remover la parte superior del disco, y a continuación de ser disecados el estómago y las gónadas, es posible apreciar las zonas de musculatura mandibular. Las mandíbulas son operadas por series concéntricas de musculatura (Fig. 3.8 1). La musculatura mandibular más grande y de mayor importancia es la de los músculos externos interradales que se ubican entre las dos placas orales adyacentes que conforman una mandíbula (musculatura abradial de las placas orales), por lo tanto ocupando una posición interradales (Fig. 3.8 2). Dos placas orales adyacentes pertenecientes a distintas

mandíbulas se encuentran conectadas mediante el músculo radial (musculatura adradial de las placas orales) (Fig. 3.8 3), el cual tiene mayor desarrollo superior y luego reduciéndose ventralmente. Los músculos internos interradales son los más reducidos, se encuentran conectando la parte proximal de las dos placas orales que forman una mandíbula, y están en contacto con la placa dental (Fig. 3.7 B3).

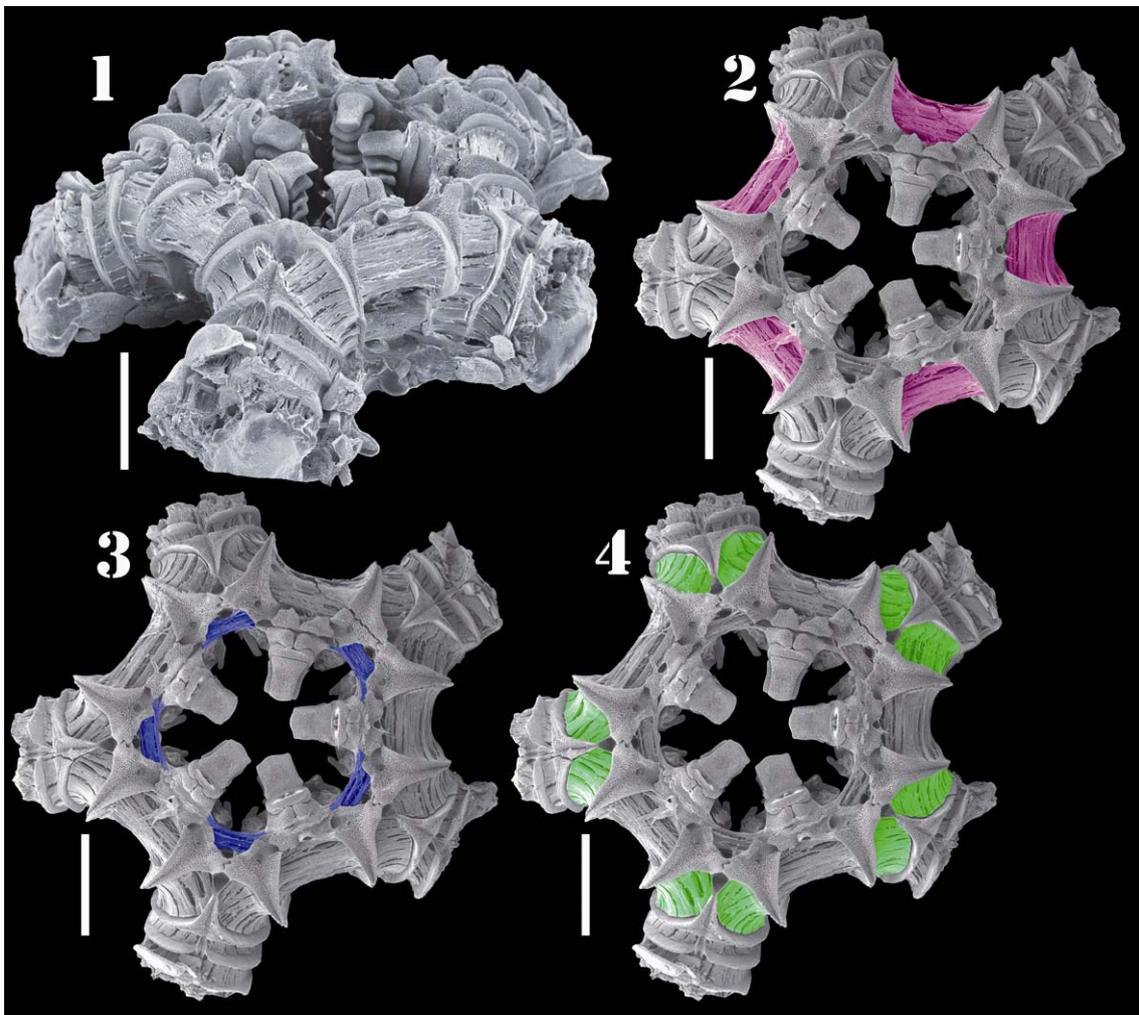


Figura 3.8. Imágenes al MEB de la mandíbula y musculatura asociada en *Ophioplocus januarii*. 1, Vista oblicua. 2, Vista dorsal donde se señala en color rosa la musculatura abradial entre las placas orales. 3, Vista dorsal donde se señala en color azul la musculatura adradial entre las placas orales. 4, Vista dorsal donde se señala en color verde la musculatura adradial de unión entre las placas orales y la primera vértebra de los brazos. Barras de escala: todas =2 mm.

La contracción de los músculos de la mandíbula genera que las mandíbulas se acerquen unas a otras permitiendo el contacto entre los dientes (Fig. 3.9). Adicionalmente, es posible que la musculatura adradial de las placas orales que unen a estas y la primera vértebra de los brazos (Fig. 3.8 4) permita el acercamiento de la zona inferior de las mandíbulas, donde los dientes son más cortos.



Figura 3.9. Disección en vista dorsal de un individuo que presentaba mayor acercamiento entre los dientes. 1, Detalle donde se puede apreciar la musculatura externa interrredial contraída. 2, Igual que la anterior pero con remoción de la musculatura. Barras de escala: ambas =4 mm.

3.3.3 Relaciones morfométricas

Se analizó un total de 165 individuos, cuyas tallas de diámetro mayor de disco variaron entre 1,5 mm y 20,7 mm (promedio \pm DS: 14,5 \pm 4,2 mm). El número de dientes registrados para todas las tallas osciló entre 4 y 12, incrementándose su número según las tallas de los individuos (Fig. 3.10).

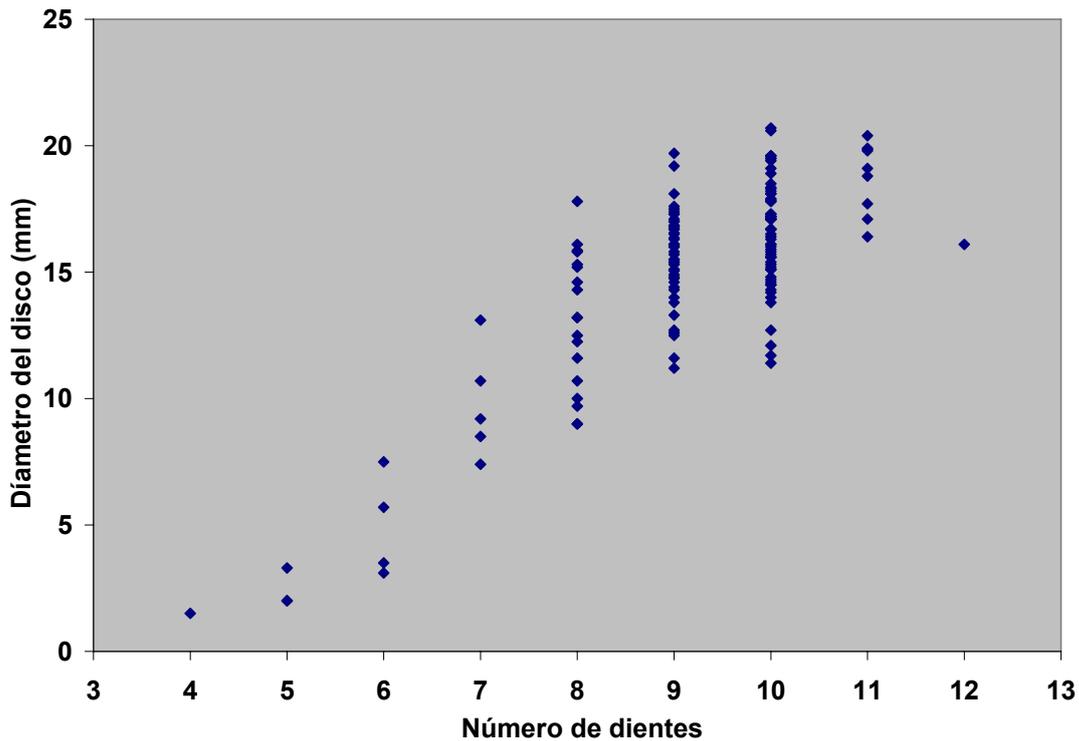


Figura 3.10. Variación del diámetro del disco de *O. januarii* en función del número de dientes que presentan.

Existe una relación potencial positiva entre la talla de los individuos y el largo de la placa dental (Fig. 3.11), variando el largo de la placa dental entre 211,1 μm y 4290,7 μm (promedio \pm DS: 2835,0 \pm 821,1 μm). La relación se encuentra determinada por la siguiente ecuación:

$$D = 0,0057 * Pd^{0,9862} \quad (1)$$

Dónde D es el diámetro del disco (en milímetros) y Pd es el largo de la placa dental (en micrómetros). El largo de la placa dental es un excelente predictor del diámetro del disco en *O. januarii* ($R^2 = 0,95$).

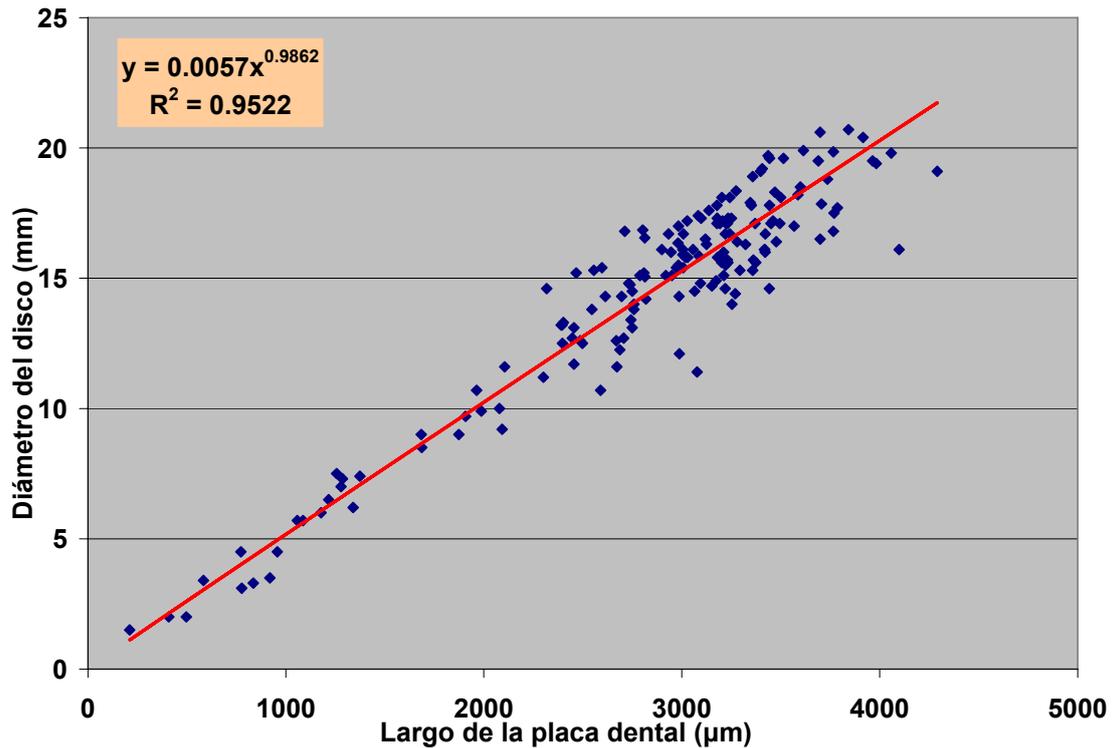


Figura 3.11. Relación morfométrica entre el largo de la placa dental y el diámetro del disco de los individuos. La regresión corresponde a una relación potencial.

También se observa una relación potencial positiva entre el diámetro del disco de los individuos y el largo de los tres primeros dientes (Fig. 3.12), registrándose una variación en el largo del diente 1 entre 121,9 μm y 1239,8 μm (promedio \pm DS: 789,8 \pm 204,2 μm), para el diente 2 entre 96,4 μm y 1061,1 μm (promedio \pm DS: 676,1 \pm 174,0 μm) y para el diente 3 entre 59,6 μm y 947,2 μm (promedio \pm DS: 597,5 \pm 156,9 μm). Las relaciones se encuentran determinadas por las siguientes ecuaciones:

$$D = 0,0049 * d_1^{1,1959} \tag{2}$$

$$D = 0,0063 * d_2^{1,1877} \tag{3}$$

$$D = 0,0116 * d_3^{1,1144} \tag{4}$$

Dónde D es el diámetro del disco (en milímetros) y d_x es el largo del diente (en micrómetros). El largo de los tres primeros dientes es un buen predictor del diámetro del disco en *O. januarii* (diente 1: $R^2 = 0,85$; diente 2: $R^2 = 0,86$; diente

3: $R^2 = 0,85$). Debido a la variación en el número de dientes según el tamaño de los individuos sólo se consideraron los tres primeros dientes, presentes y mesurables en todos los ejemplares.

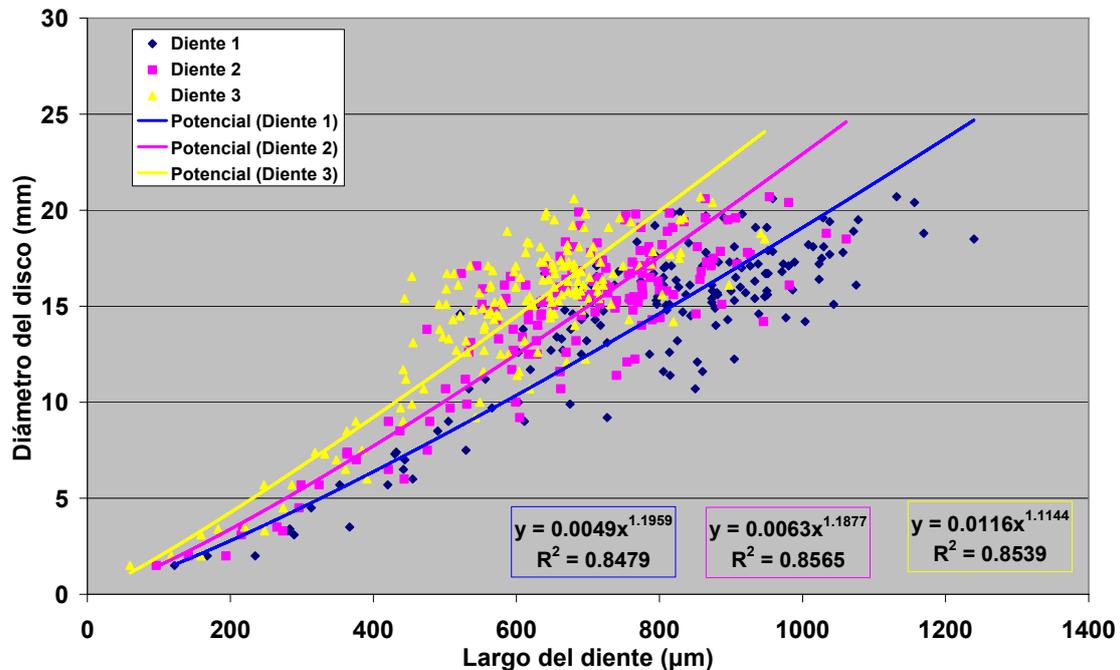


Figura 3.12. Relación morfométrica entre el largo de los tres primeros dientes y el diámetro del disco de los individuos. Las regresiones corresponden a relaciones potenciales.

3.4 Discusión

Diversos autores han descrito la morfología externa de *Ophioplocus januarii* (Thomas, 1975; Bernasconi y D’Agostino, 1977; Bartsch, 1982), registrándose aquí las distintas partes por ellos observadas. En el presente estudio no se observaron papilas dentales ni infradentales. Para esta especie Lyman (1865) considera papilas dentales al par proximal de papilas orales, que en realidad se encuentran lateralmente y no sobre la placa dental, mientras que Bernasconi y D’Agostino (1977) consideran la existencia de una papila

infradental impar y muy pequeña, lo cual no sería otra cosa que el punto de calcificación de un nuevo diente ventral. También se observaron diferencias en cuanto al número de fragmentos de las placas dorsales de los brazos. Para Bernasconi y D'Agostino (1977) estas placas se encuentran "fracturadas en 4-5 partes, rara vez bipartitas, excepto en la extremidad de los brazos, donde este carácter parece ser normal"; sin embargo en los ejemplares aquí estudiados las placas dorsales se presentan bipartitas simétricamente en todo el brazo, existiendo solamente algunas veces tres partes en algunos segmentos. Por su parte Thomas (1975), quien transfiere la especie al género *Ophioplocus*, indica que las placas dorsales de los brazos se encuentran divididas en 2 a 5 fragmentos, e incluso en su esquema de *O. januarii* presenta las placas dorsales muy fragmentadas en patrón asimétrico. Adicionalmente, Irimura y Fujita (2003) analizan la variación morfológica en los osículos vertebrales de 61 especies de ofiuroideos, reportando que en *Ophioplocus japonicus* la línea de sutura sólo se presenta en la superficie oral. En *O. januarii* esta sutura se puede apreciar tanto en la superficie oral como la aboral.

El único trabajo previo donde se menciona la morfología mandibular de esta especie es el de Bartsch (1982), quien reporta similares observaciones a las aquí registradas en cuanto a la forma y tamaño de las placas dentales y orales. Murakami (1963) describe las placas dentales de *Ophioplocus imbricatus* y *O. japonicus*, sin hacer referencia a algún tabique que divida los forámenes superiores. En el mismo trabajo también describe las placas orales de estas dos especies cogenéricas de *O. januarii*, que presentan un área de musculatura abradial de tamaño moderado y un área de musculatura adradial grande, observaciones que no concuerdan con lo visto aquí para *O. januarii*.

Basados en diferencias observadas en cuanto a dieta, comportamiento alimentario y características morfológicas de la mandíbula en una especie de ofiuroides antártico, Dearborn *et al.* (1996) sugieren la necesidad de tener en cuenta estas diferencias en posteriores revisiones de las familias. Más recientemente Stöhr y Muths (2010) realizan una diagnosis morfológica para esclarecer las diferencias observadas en estudios moleculares sobre un complejo de tres especies similares, observando que uno de los caracteres morfológicos más significativos que permiten la diferenciación de las especies es la forma y estructura de las placas orales. Es posible que posteriores comparaciones que tengan en cuenta los caracteres morfológicos aquí descritos permitan dilucidar diferencias específicas dentro del género *Ophioplocus*, y así corroborar o corregir las acciones taxonómicas realizadas por Thomas (1975).

La particularidad de presentar una mayor longitud en los dientes dorsales y menor longitud en los ventrales les permitiría a los individuos ofrecer una mayor apertura para el ingreso del alimento en la zona ventral y una mayor compresión en la zona dorsal. Un movimiento frontal entre mandíbulas a nivel de los dientes dorsales cumpliría una función de compactación del alimento previo a su ingreso al estómago, mientras que un ligero encastramiento lateral entre mandíbulas vecinas en la zona ventral permitiría una compactación parcial colaborando con el empaquetamiento del alimento. La musculatura mandibular bien desarrollada indica que las mandíbulas son altamente móviles (Charlina *et al.*, 2009). Según Boos (2008) la morfología de los dientes está directamente relacionada con el tipo de alimentación, pudiéndose diferenciar especies macrófagas o micrófagas según si presentan dientes largos y puntiagudos, o

de forma relativamente cuadrada y de superficie plana, respectivamente. Dado que *O. januarii* presenta las últimas características, se podría proponer su tipo de alimentación como micrófaga (ver “Alimentación”).

El crecimiento dorsal y ventral de la sección proximal de la placa oral permitiría la elongación de la placa dental y el desarrollo de un nuevo diente dorsal y/o ventral a medida que crecen los individuos, observándose mayor número de dientes en individuos de mayor talla. El desarrollo de la placa dental y la formación de nuevos dientes aquí descritos no tiene antecedentes en la clase Ophiuroidea (Sabine Stöhr, com. pers.). Las descripciones de Clark (1914) sobre el crecimiento de estas estructuras en *Amphipholis squamata*, *Ophiactis savignyi* y *Ophiothrix (Ophiothrix) angulata* reportan un desarrollo ventral de la placa dental con la formación de nuevos dientes en serie de arriba hacia abajo, siendo los dientes dorsales los más antiguos. Si bien existen pocos estudios dónde se haya descrito la formación de nuevos dientes en las mandíbulas de ofiuroideos, pudiera ser que este desarrollo sea distinto entre las especies o dentro de los taxones (a nivel de familia o infraorden). La nomenclatura propuesta para nombrar y numerar los dientes es también aplicable a otras especies para las cuales se ha descrito un desarrollo dental en sentido dorsal-ventral exclusivamente, donde el diente dorsal (diente 1) es el primero que se ha formado, y luego la numeración se corresponde con el orden de aparición. Para estas especies no es correcto aplicar el término de “diente 0”, ya que haría referencia al diente ventral en reciente formación y puede ser nombrado con la numeración correspondiente.

En *O. januarii* es posible estimar el diámetro del disco de los individuos a partir de la longitud de la placa dental y de los tres primeros dientes. Existe una

relación potencial positiva para la morfometría de estos caracteres, observándose un muy buen ajuste de las regresiones calculadas. Este tipo de relaciones son muy útiles en estudios de crecimiento en ofiuroides donde se requiera de la transformación de datos de mediciones de ciertas partes del cuerpo que representen pulsos de crecimiento (e.g. Gage, 1990, 2003) o en estudios de crecimiento empleando marcado químico (e.g. Medeiros-Bergen y Ebert, 1995; Stewart, 1995). Recientemente se ha reportado la presencia de marcas de crecimiento en distintas partes del cuerpo de *O. januarii*, incluyendo las mandíbulas, en estudios de marcado químico con calceína (Rodríguez *et al.*, 2008; Rodríguez, 2009). Las ecuaciones de las relaciones morfométricas observadas en el presente estudio se utilizarán para el desarrollo de los estudios de crecimiento en esta especie (ver “Crecimiento”).

4- ALIMENTACIÓN

4. Alimentación.

4.1 Introducción

En los ofiuroides usualmente parece existir una fuente de alimentos o estrategia alimentaria principal y, como amplia generalización, se pueden reconocer dos grandes grupos. Un grupo lo constituyen los carnívoros, depredadores o carroñeros, representados por las familias Ophiomyxidae, Ophiodermatidae y Ophiolepididae. El otro abarca los ofiuroides micrófagos, incluyendo miembros de las familias Ophiocomidae, Amphiuridae, Ophiactidae y Ophiothrichidae. Los últimos se alimentan de pequeñas partículas del sustrato o de partículas en suspensión en el agua. Para el resto de las familias se desconocen datos suficientes como para generalizar sus estrategias alimentarias (Warner, 1982).

La principal información acerca de la dieta de ofiuroides se basa en observaciones de campo, estimando las preferencias alimentarias en base al comportamiento observado (Warner, 1982), o en análisis de contenidos estomacales (Harris *et al.*, 2009). Según el comportamiento se pueden identificar especies con hábitos suspensívoros o activas depredadoras (Davoutt y Gounin, 1995), mientras que es difícil observar directamente aquellas especies que se alimentan directamente del fondo o por debajo del mismo (Gielazyn *et al.*, 1999). Los estudios de contenidos estomacales permiten identificar las especies macrófagas a partir de los ítems presa encontrados, o estimar el origen de la fuente de alimento, en los casos que se observa sedimentos o ítems correspondientes a la columna de agua (Ferrari y Dearborn, 1989; Dahm, 1999).

Los osículos de los equinodermos presentan una microestructura muy típica, a modo de finas redes de carbonato de calcio (calcita) formando una estructura que se conoce como estereoma. Cada elemento esquelético de los equinodermos es en realidad un único cristal de carbonato de calcio, finamente estructurado y ramificado (Hyman, 1955). Medeiros-Bergen (1996) analizó la microestructura del estereoma de los dientes de 43 especies de ofiuroideos, incluyendo en su análisis a *Ophioplocus januarii*. De sus observaciones empleando microscopía óptica y de barrido (sólo para algunas especies) concluyó que hay dos tipos básicos de dientes, los uniformes y los compuestos. Los primeros son dientes con estereoma completamente fenestrado, mientras que los segundos son dientes donde la base es fenestrada pero la otra mitad de los dientes se conforma por calcita no perforada. Según esta autora, las especies macrófagas presentan dientes uniformes, mientras que las micrófagas tienen dientes compuestos. También observó que, con algunas excepciones, el tipo de diente es un carácter que se conserva a nivel de familia. Respecto a *O. januarii* concluye, basada en observaciones al microscopio óptico y observando a la especie cogenérica *Ophioplocus esmarki* al MEB, que se trata de una especie con dientes uniformes y por lo tanto se trataría de una especie macrófaga.

Objetivos específicos

Determinar la estrategia alimentaria de *Ophioplocus januarii* en base al análisis de contenidos estomacales, observaciones en campo del comportamiento alimentario y análisis morfológico de la microestructura del estereoma de los dientes.

4.2 Metodología

Contenidos estomacales

Se trabajó con las muestras obtenidas según se indica en “Metodología general”. Se analizaron los contenidos estomacales de 10 individuos de *Ophioplocus januarii* para cada mes (250 ejemplares en total). Los estómagos fueron disecados bajo microscopio estereoscópico y se separó todo el material identificable. Ante la presencia de material digerido o inidentificable para la resolución, se sacaron porciones para su observación bajo microscopio óptico. Adicionalmente se realizaron preparados para microscopía electrónica de barrido. Las partículas retenidas en las bolsas de colección fueron observadas bajo microscopio estereoscópico.

Se consideró que los estómagos donde se logró identificar al menos un ítem bajo microscopio estereoscópico presentaban contenido estomacal, incluyendo la presencia de restos inidentificables o material en proceso de digestión como ítem. Únicamente aquellos sin contenido alguno fueron considerados como vacíos.

Observaciones en campo

Durante el curso de los muestreos se observó y fotografió a los individuos en campo, con el fin de reconocer actividades de alimentación. Todas las observaciones se realizaron durante el día.

Dientes y alimentación

Los dientes estudiados corresponden a los individuos de *O. januarii* utilizados en la descripción morfológica de la mandíbula (ver “Morfología”). Se realizó una fractura en un diente con el fin de observar la disposición interna de

la matriz de calcita. Adicionalmente y con fines comparativos se disecaron las mandíbulas de otras especies de ofiuroides:

Amphipholis squamata (Delle Chiaje, 1828) (Familia Amphiuridae).

Ophiacantha vivipara Ljungman, 1870 (Familia Ophiacanthidae).

Ophiactis asperula (Philippi, 1858) (Familia Ophiactidae).

Ophiocten amitinum Lyman, 1878 (Familia Ophiuridae).

Ophiomyxa vivipara Studer, 1876 (Familia Ophiomyxidae).

Todas las mandíbulas y los dientes fueron preparados para su observación en el microscopio electrónico de barrido.

4.3 Resultados

4.3.1 Contenidos estomacales

Las partículas remanentes en las bolsas resultaron ser pequeños fragmentos de conchillas mezcladas con trozos de algas, similares a las que se observan algunas veces retenidas o enganchadas en las espinas de los brazos y/o disco. En ningún caso se observaron indicios de que se tratara de contenidos estomacales evertidos por los individuos antes de ser fijados y preservados.

Se observó contenido estomacal en el 31,2% de los 250 individuos examinados, de los cuales el 64,1% presentó un único ítem, siendo menos frecuentes los estómagos con entre dos y cinco ítems diferentes (Tabla 4.1). El ítem más frecuentemente encontrado corresponde a fragmentos de macroalgas de formas filamentosas, principalmente, y algunas formas laminares. El tamaño de las partículas ingeridas estuvo siempre en el orden del medio milímetro o menor, con excepción de dos casos en los que se observó un fragmento de

macroalga (6,0 mm) y una estructura cuticular (7,5 mm). El número de ítems promedio por individuo fue igual a 1,64.

Tabla 4.1: Total de estómagos con contenido estomacal y frecuencia de tipos de ítems observados.

	Número	Porcentaje
Individuos analizados	250	-
Con contenido estomacal	78	31,2
Con un tipo de ítem	50	64,1
Con dos tipos de ítems	13	16,6
Con tres tipos de ítems	9	11,5
Con cuatro tipos de ítems	5	6,4
Con cinco tipos de ítems	1	1,3

Las algas estuvieron presentes en el 60% de los estómagos analizados que presentaban contenido estomacal y en el 64% de los meses estudiados (Tabla 4.2). Los otros ítems más frecuentes encontrados fueron material inidentificable a la lupa (en el 31%) y pequeñas estructuras semejantes a tricomas de plantas terrestres (en el 28%) de forma estrellada, algunos con base plegada helicoidalmente (Fig. 4.1 A, B). Otros ítems menos frecuentes fueron estructuras cuticulares animales (13%), estructuras laminares no identificadas (8%), espículas (4%), tres foraminíferos, tres ostrácodos, un anfípodo, otros crustáceos, un bivalvo juvenil, colonia de hidrozooos, un arácnido y un hexápodo.

De los 25 meses analizados sólo en 3 no se observó contenido estomacal. Los ítems más frecuentes se encontraron en varios meses, sin estacionalidad aparente. Únicamente para dos meses, febrero de 2006 y diciembre de 2006, se observó un mayor porcentaje de individuos con contenidos estomacales (el 80%) y hasta 6 ítems diferentes para todo el mes (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Cantidad de estómagos que presentan cada ítem y total de ítems para cada mes de estudio.

	2005												2006												2007				Total
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A				
Fragmentos de macroalgas	2	3	2				3	1	2		8	2		1		2		1	2	3	8	2	2		1	45			
Estructuras cuticulares				1					2		5	1								3	1					13			
Ostrácodo							1													2						3			
Crustáceos no identificables			1								1									1						3			
Foraminíferos									1											1	1					3			
Espículas																	4									4			
Tricomas		1	1		1		1	1	1		2	1	1	1			1	2		6		2				21			
Anfípodo											1															1			
Láminas no identificables					7	1																				8			
Hexápodo												1														1			
Araña							1																			1			
Bivalvo juvenil								1																		1			
Hidrozoo																							1			1			
Material digerido							1	1		7						1	2		8	2				1		23			
Total	2	4	4	1	7	2	6	3	7	0	24	4	2	2	0	2	6	3	4	9	23	8	3	0	2				

Pequeñas porciones del material no identificable a la lupa fueron observadas mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, resultando ser material digerido o inidentificable, componentes del plancton y material de resuspensión, principalmente diatomeas (Fig. 4.1 C, D, E).

Página siguiente: **Figura 4.1.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de contenidos estomacales. **A-** Estructura similar a tricomas de plantas terrestres. **B-** Otra estructura de tricomas. **C-** Material no identificable y diatomea. **D-** Dos tipos de diatomeas observadas. **E-** Extremo de una diatomea. Barras de escala: A =100 µm; B =20 µm; C =10 µm; D, E =2 µm.

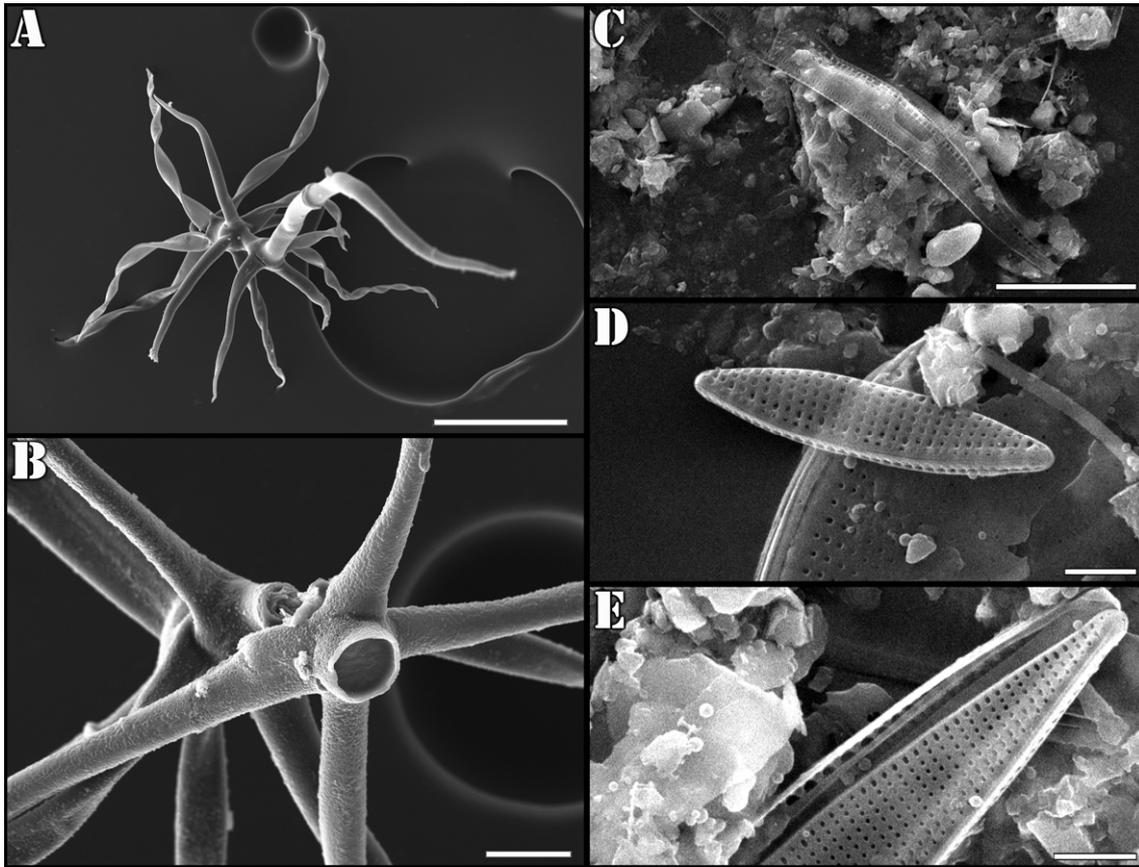


Figura 4.1.

4.3.2 Observaciones en campo

Fue posible registrar en varias oportunidades comportamientos correspondientes a las actividades de alimentación del tipo suspensívora. Los individuos de *O. januarii* permanecen ocultos en grietas o huecos, otras veces libres sobre el fondo, mientras despliegan dos o tres brazos curvándolos hacia arriba, mientras que mantienen los pies ambulacrales extendidos hacia la corriente de agua (Fig. 4.2).

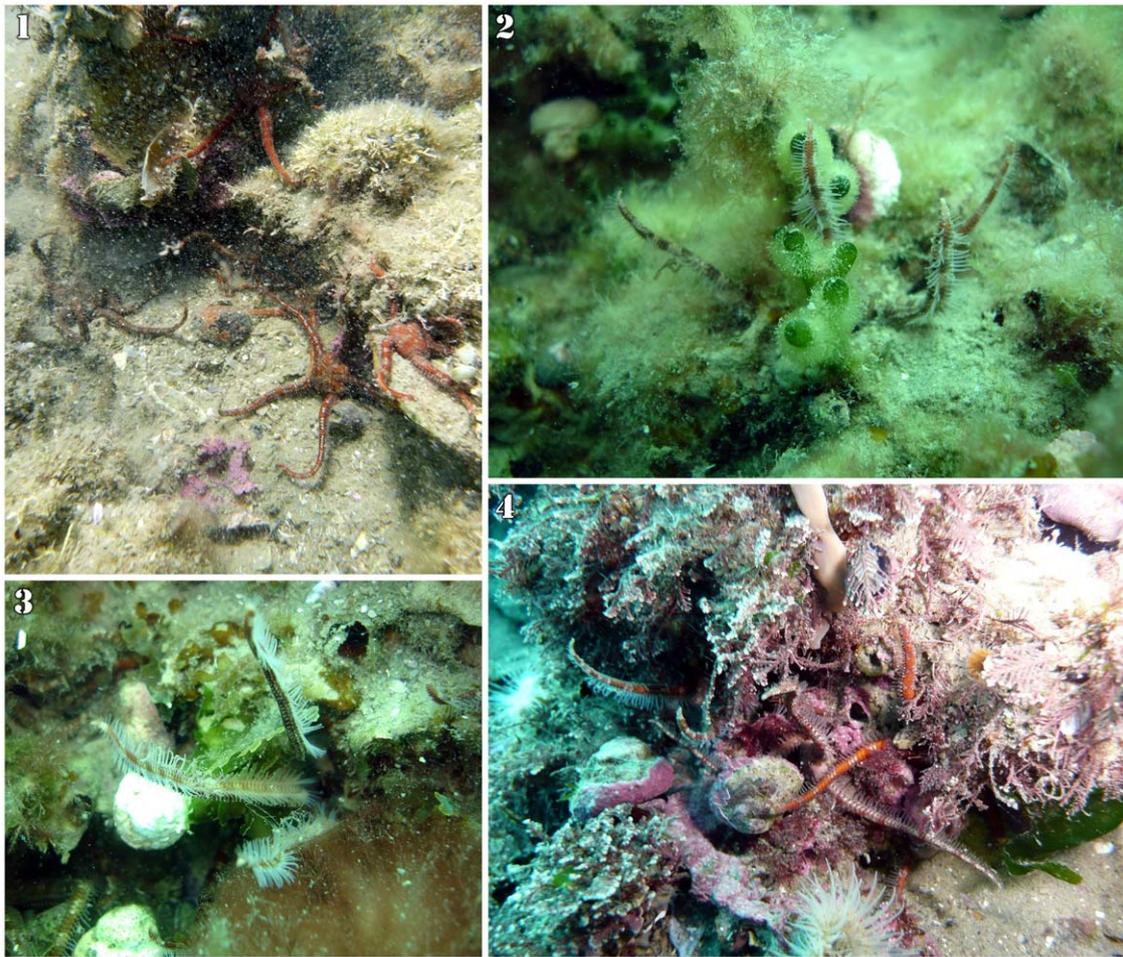


Figura 4.2. Comportamiento alimentario de *Ophioplocus januarii* en campo. 1, Grupo de individuos; nótese las partículas en suspensión. 2, Individuo oculto entre las algas. 3, Individuo oculto en una grieta; nótese la posición extendida de los pies ambulacrales. 4, Grupo de individuos ocultos en grietas, extendiendo sus brazos.

4.3.3 Dientes y alimentación

Todos los dientes de *O. januarii* se presentan con una microestructura de estereoma fenestrado (Fig. 4.3). Sin embargo, es posible identificar claramente dos regiones en los mismos: la porción basal de los dientes, en contacto con la placa dental, se encuentra muy perforada mientras que la porción proximal presenta menor cantidad de perforaciones, encontrándose la calcita más compactada (Fig. 4.3 A). En las imágenes de MEB se pueden identificar estas dos áreas ya que a mayor perforación se observa un aspecto

más oscuro, mientras que la mayor compactación de la calcita limita una región más blanquecina. Esta diferencia observada superficialmente en los dientes también se puede observar en los preparados con dientes fracturados (Fig. 4.3 D, E), especialmente en la porción interna más distal del diente.

En la parte superficial de la región más fenestrada es posible reconocer pequeños bordes aserrados (Fig. 4.3 C), pero en la región menos perforada los mismos son menos notorios al presentarse la calcita más compactada.

Página siguiente: **Figura 4.3.** Dientes de *Ophioplocus januarii*. **A-** Diente dorsal. **B-** Diente medio. **C-** Detalle de B. **D-** Diente fracturado. **E-** Detalle de D. **F-** Detalle en vista proximal de los dientes dorsales. **G-** Vista proximal de los dientes ventrales. **H-** Detalle de G. Barras de escala: A, B, D, F, G, H =200 μm ; C, E =50 μm .

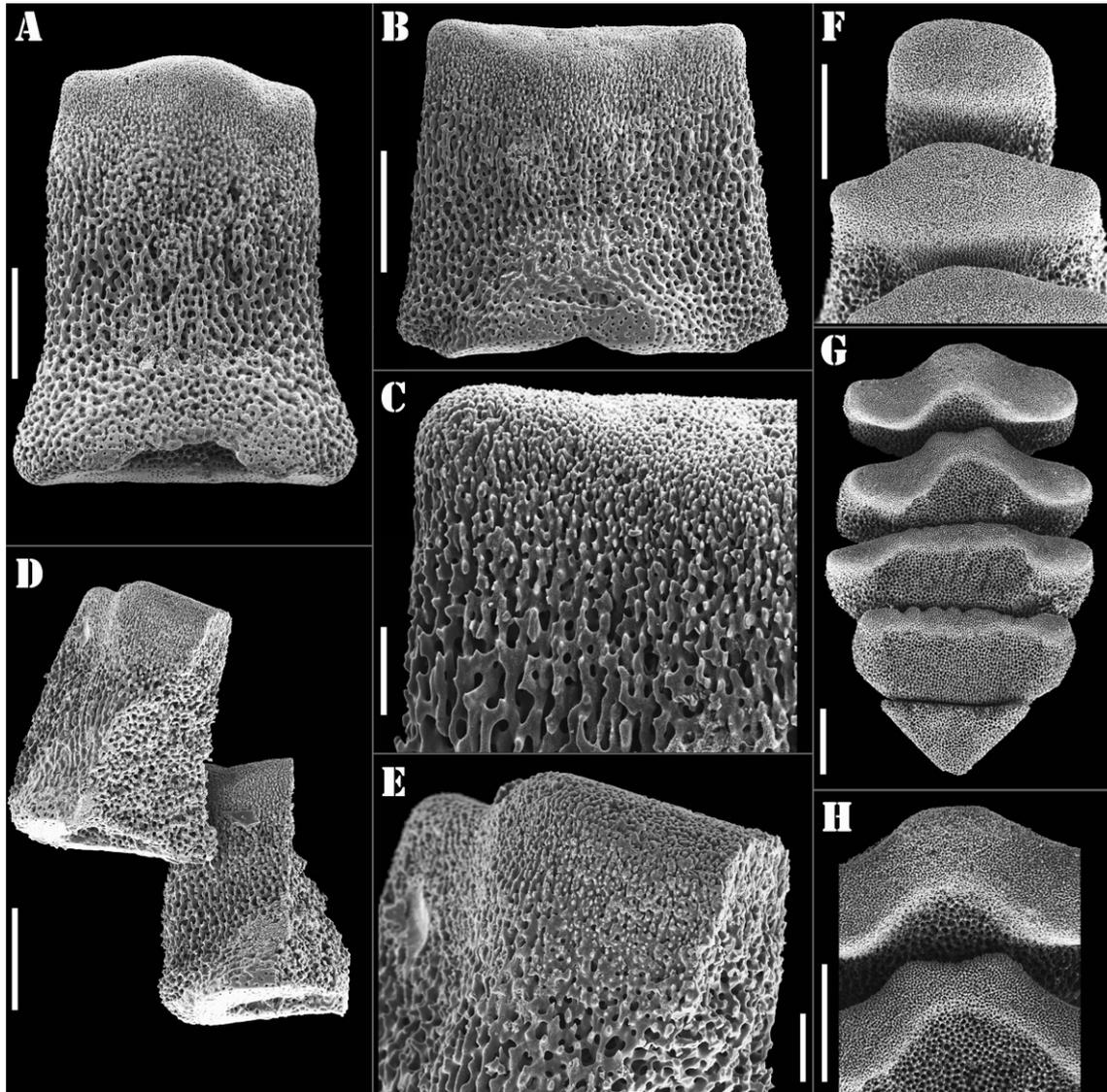


Figura 4.3.

También se observaron distintos arreglos en la matriz de calcita de los dientes de las otras cinco especies estudiadas. Los dientes de *Ophiacantha vivipara* y de *Ophiocten amitinum* presentan forma de espina con su superficie totalmente perforada de manera uniforme, y con claros bordes aserrados en toda la superficie (Fig. 4.4 A, B). Los dientes de *Ophiactis asperula* son rectangulares y perforados, pero con más compactación de calcita en su parte distal (Fig. 4.4 D). Bajo microscopio estereoscópico se observa que los dientes

de *Ophiomyxa vivipara* presentan un borde con pequeñas espinas en la periferia de una región cristalina traslúcida; estos dientes se encuentran perforados en toda su superficie salvo en las espinas y presentan una forma similar a un semicírculo (Fig. 4.4 C). Los dientes de *Amphipholis squamata* son rectangulares casi cuadrados, y presentan una base perforada mientras que la otra mitad del diente se presenta como calcita sin perforaciones de ningún tipo (Fig. 4.4 E).

Página siguiente: **Figura 4.4.** Imágenes de MEB de los dientes de otras especies. **A-** *Ophiacantha vivipara*. 1, Vista lateral de una mandíbula. 2, Diente ventral. 3, Diente dorsal. **B-** *Ophiocten amitinum*. 1, Vista proximal de una mandíbula. 2, Diente. **C-** *Ophiomyxa vivipara*. 1, Vista lateral de una mandíbula. 2, Diente. 3, Vista proximal de un diente. **D-** *Ophiactis asperula*. 1, Vista lateral de una mandíbula. 2, Diente. **E-** *Amphipholis squamata*. Vista dorsal de dos mandíbulas con dientes. Barras de escala: B2, C3, E =100 µm; A2, A3, B1, C2, D =200 µm; A1, C1 =500 µm.

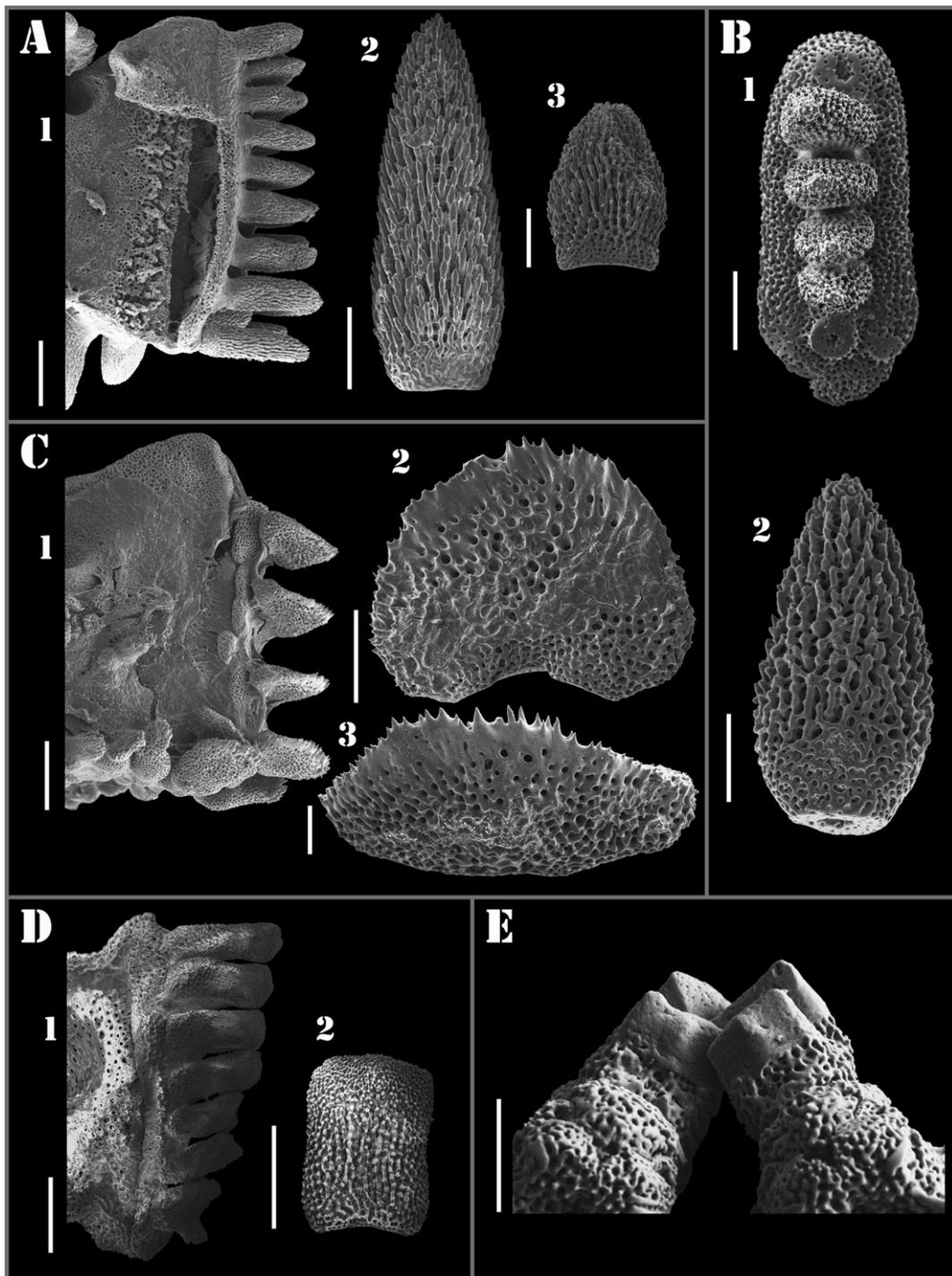


Figura 4.4.

Además de la variación en forma y microestructura de los dientes de estas especies también se observaron diferencias en cuanto a la disposición de los dientes en la mandíbula. Los dientes dorsales son más grandes respecto a

los ventrales en *O. amitinum* y *O. asperula* (Fig. 4.4 B y D, respectivamente), como ocurre en *O. januarii* (ver "Morfología"), son similares en tamaño en *Ophiomyxa vivipara* (Fig. 4.4 C), mientras que en *Ophiacantha vivipara* los dientes dorsales son más chicos que los inferiores (Fig. 4.4 A).

La forma y la microestructura de los dientes de *O. januarii* es distinta a las observadas para la especie cogenérica *Ophioplocus esmarki* (Fig. 4.5 A). Esta especie presenta dientes de forma semicircular y completamente fenestrados. Los dientes de otras especies (Fig. 4.5) se presentan de diferentes formas y en el patrón de dientes uniformes o compuestos.

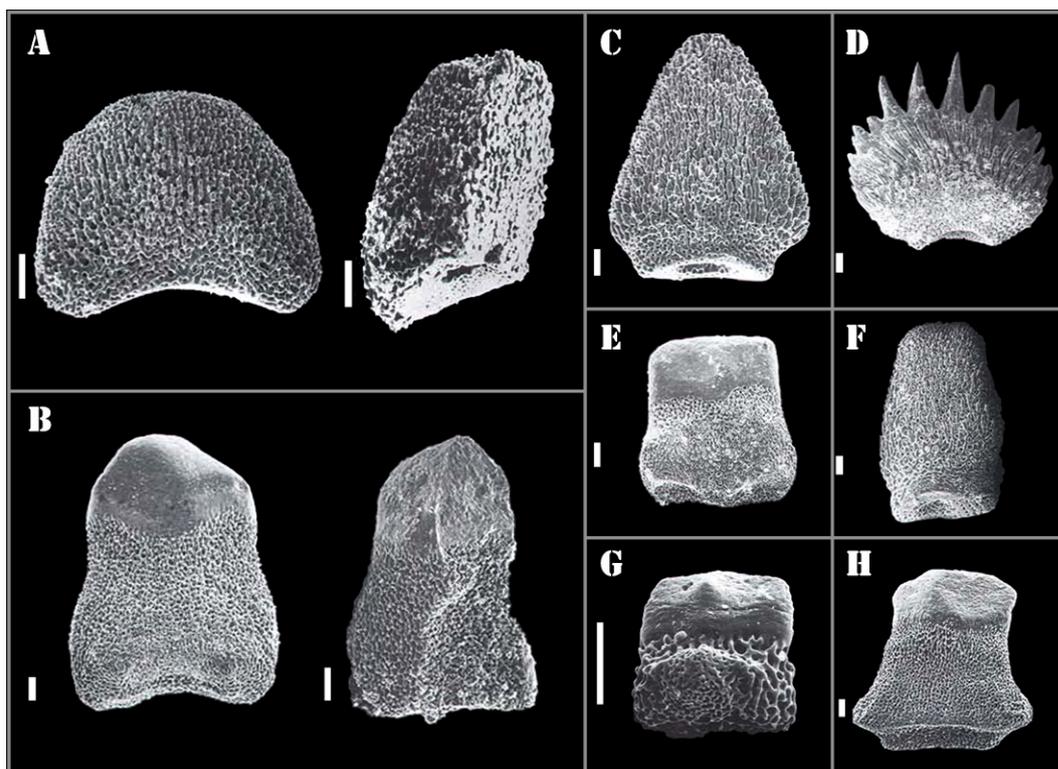


Figura 4.5. Imágenes de MEB de los dientes de otras especies. **A-** Diente entero (izq.) y diente fracturado (der.) de *Ophioplocus esmarki*. **B-** Diente entero (izq.) y diente fracturado (der.) de *Ophionereis annulata*. **C-** Diente de *Ophioderma appressa*. **D-** Diente de *Ophiomyxa flaccida*. **E-** Diente de *Ophiocoma pumila*. **F-** Diente de *Ophiopteris papillosa*. **G-** Diente de *Amphipholis squamata*. **H-** Diente de *Ophiothrix (Ophiothrix) rudis*. Barras de escala: todas =70 μ m. Imágenes tomadas de Medeiros-Bergen (1996).

4.4 Discusión

La población de *Ophioplocus januarii* de playa Villarino se alimenta ingiriendo pequeñas partículas en suspensión y componentes del plancton de la interfase agua-sedimento. Contrariamente a lo especulado previamente (Warner, 1982; Medeiros-Bergen, 1996), y en concurrencia con lo estimado en el capítulo anterior (ver "Morfología"), se trata de una especie micrófaga que se alimenta de manera oportunista principalmente del material en resuspensión. En aguas poco profundas, como la zona de estudio, posiblemente este material de resuspensión se encuentre en gran abundancia debido al régimen de mareas semidiurno con amplitudes máximas de hasta 8 metros (Amoroso, 2003) que produce mezcla de la columna de agua. El único reporte previo de observaciones de los contenidos estomacales en *O. januarii* es el realizado por Bartsch (1982), quien analiza muestras de 60 metros de profundidad y observa para algunos especímenes estómagos vacíos salvo por la presencia de algunos granos de sedimento. En el presente estudio no se registraron partículas de sedimento en los contenidos estomacales, lo cual podría indicar diferencias en las preferencias alimentarias de esta especie según el hábitat. Esto mismo ha sido registrado también para diferentes poblaciones de *Ophiura ophiura* (Blegvad, 1914 en Warner, 1982) y de *Ophionotus victoriae* (Dearborn, 1977).

La principal distinción en las preferencias alimenticias de los ofiuroideos ha sido entre los carnívoros y los micrófagos. Aquellas especies que capturan grandes partículas, los macrófagos, son generalmente descriptos como carnívoros, mientras que las especies micrófagas se alimentan de una mezcla de material animal y vegetal (Warner, 1982). La dieta de *O. januarii* indica que

se trata de una especie omnívora, alimentándose principalmente de fragmentos de algas y tricomas de plantas, complementando con otros ítems de manera oportunista. También para otras especies se ha reportado preferencia alimentaria por material de origen vegetal, pero casi siempre asociado a sedimentos. *Ophionereis reticulata* ha sido registrada como exclusivamente herbívora (May, 1925 en Warner, 1982) y más recientemente como omnívora con preferencia por algas (Yokoyama y Amaral, 2008). Fragmentos de algas y partículas calcáreas son los ítems más frecuentes en *Ophiocoma wendtii*, *O. echinata* y *O. pumila* (Sides y Woodley, 1985).

Los porcentajes de estómagos vacíos encontrados para distintas especies son variables en los análisis de contenidos estomacales. Harris *et al.* (2009) observan un 66% de estómagos vacíos en *Ophiura sarsii*, Yokoyama y Amaral (2008) un 23% en *Ophionereis reticulata*, Hendler (1982) observa variaciones en los porcentajes (100 a 5%) según los meses de estudio, y Hendler y Miller (1984) observan para *Asteroporpa (Asteroporpa) annulata* que hay diferencias según si los ejemplares son capturados durante el día o la noche. El porcentaje de estómagos vacíos observados en *O. januarii* fue cercano al 70%, descartándose la posibilidad de eversión de contenidos durante el procesamiento de los animales, y observándose actividad alimentaria al menos durante el día.

Hendler (1982) observa en *Ophioderma brevispina* una correlación positiva entre el porcentaje de individuos alimentándose y la temperatura del agua, ocurriendo un cese de alimentación durante los meses de invierno, mientras que Pearson y Gage (1984) registran para *Ophiocten gracilis* una reducción marcada de estómagos con contenido en el verano, coincidiendo con

el desarrollo estacional de las gónadas. Para *O. januarii* no se detectó estacionalidad en la presencia de los distintos ítems a lo largo de los meses de estudio. Si bien para dos meses estudiados, correspondientes al verano, se registró un mayor porcentaje de individuos con contenidos estomacales parecería que la alimentación es independiente de las fluctuaciones estacionales.

En cuanto a la microestructura del estereoma de los dientes de distintas especies es posible reconocer los dientes completamente fenestrados (dientes uniformes según Medeiros-Bergen (1996)) y los dientes mixtos con base fenestrada y extremo distal sin perforaciones (dientes compuestos según Medeiros-Bergen (1996)). *Ophioplocus januarii* presenta un diente totalmente fenestrado, pero con una variación en la compactación de la calcita en el extremo distal. Esta particular microestructura intermedia podría estar relacionada con los hábitos alimenticios de microfagia observados en esta especie, resultando similares a los dientes compuestos de las otras especies micrófagas. Similar microestructura intermedia se observó en los dientes de *Ophiactis asperula* en el presente estudio.

Respecto a la forma de los dientes, las variaciones corresponden a formas rectangulares (en algunos casos más cuadrangulares), formas de espina, formas semicirculares y formas de “cabeza de hacha”. Los dientes de las especies micrófagas (dientes compuestos o intermedios, según la microestructura) presentan formas rectangulares o cuadrangulares, mientras que los de las especies macrófagas (dientes uniformes) exhiben generalmente formas puntiagudas o semicirculares, con superficies aserradas correspondientes a las trabéculas. Estas observaciones respaldan lo expresado

por Boos (2008) quien afirma que se puede diferenciar las especies macrófagas de las micrófagas según si presentan dientes largos y puntiagudos, o de forma relativamente cuadrada y de superficie plana, respectivamente.

Los resultados observados sobre la dieta de *O. januarii* representan el primer caso de microfagia en la familia Ophiolepididae. Estudios de dieta en *Ophiolepis elegans* indicarían que se trata de una especie macrófaga (Warner, 1982), mientras que Medeiros-Bergen (1996) basada en la microestructura de los dientes estima para cuatro especies del género *Ophioplocus* (incluyendo *O. januarii*) y para *Ophiolepis impressa* que se tratan de especies macrófagas. Para otras dos especies de la familia (*Ophioplocus incipiens* y *Ophiomusium lymani*) se han reportado actividades de alimentación suspensívora (Warner, 1982; Pearson y Gage, 1984), sin información sobre su dieta. Sin contar algunas especies de Euryalida, que despliegan sus brazos para cazar a sus presas, no hay registros de especies macrófagas que se alimenten de manera suspensívora (Warner, 1982), por lo cual es probable que tanto *O. incipiens* y *O. lymani* también sean especies micrófagas dentro de la familia Ophiolepididae.

Las características morfológicas de las mandíbulas (disposición y forma de los dientes) junto a las variaciones observadas en la microestructura de los dientes estarían relacionadas directamente con las estrategias alimentarias de las distintas especies de ofiuroideos. La gran variedad de modos de alimentación reportados para esta clase permite especular en que igualmente variadas serán las combinatorias morfológicas de la mandíbula, posiblemente existiendo otras formas intermedias a las reconocidas actualmente.

5- CRECIMIENTO

5. Crecimiento.

5.1 Introducción

Existe una co-evolución de rasgos morfológicos, fisiológicos y comportamentales entre los individuos como resultados de la selección natural. Los procesos de natalidad y mortalidad, edad de madurez reproductiva, y la longevidad de los organismos son realmente significativos a la hora de estudiar el crecimiento de los individuos (Medeiros-Bergen y Ebert, 1995). El estudio del crecimiento de los organismos está íntimamente relacionado con modelos de distribución de recursos. La idea fundamental de estos modelos está basada en la cantidad de energía finita que poseen los individuos para ser procesada por unidad de tiempo. Así, las reservas utilizadas en la reproducción no pueden ser utilizadas para crecimiento. En las especies con crecimiento continuo a lo largo de su desarrollo y con éxito reproductivo ligado al tamaño, la máxima tasa reproductiva depende de la tasa de crecimiento y la tasa de supervivencia (Medeiros-Bergen y Ebert, 1995).

Para realizar estudios de crecimiento se emplean diversas técnicas o metodologías que permiten estimar las tasas teóricas de crecimiento de los individuos. Distintos marcadores fluorescentes han sido utilizados en una variedad de animales marinos como braquiópodos, poríferos, bivalvos, gasterópodos y equinodermos. Se ha observado que proporcionan resultados muy útiles en estudios de tasas de crecimiento, validación de anillos de crecimiento, determinación de edad, y localización de zonas de crecimiento (Gage, 1990, 2003; Monaghan, 1993; Dahm y Brey, 1998; Kaehler y McQuaid, 1999; Moran, 2000; Gage *et al.*, 2004). La utilización de marcadores externos (*tags*) o marcadores químicos permite distinguir los individuos experimentales

de los no marcados, y puede proveer una idea que permita cuantificar su crecimiento, supervivencia y desplazamiento (Purcell *et al.*, 2006).

En estudios anteriores se ha observado que el marcado en masa (*mass-marking*) frente al uso de marcadores externos es beneficioso, debido a que es rápido de aplicar, produce menos estrés durante el manejo y es exitoso en el marcado de huevos, larvas y juveniles (Brooks *et al.*, 1994). Entre los compuestos químicos para realizar el marcado en masa por inmersión encontramos: calceína, tetraciclina, rojo de alizarina, estroncio y lantánidos. Estos marcadores químicos no proveen ningún cambio visible en la apariencia de los individuos marcados, por lo tanto no aumenta el riesgo de depredación por parte de sus depredadores, y para la mayoría de ellos no se ve afectado el comportamiento de los animales (Morán, 2000; Bashey, 2004).

El estroncio y los lantánidos son análogos del calcio, que actúan depositándose en estructuras calcificadas, permitiendo detectar una marca de crecimiento, pero se requiere un espectrómetro de masa o el uso de microscopio electrónico de barrido para detectarla (Bashey, 2004). La tetraciclina fluoresce cuando se expone a luz ultravioleta, pero afecta el comportamiento, crecimiento y mortalidad de los ejemplares, y produce daños a nivel del medioambiente (Bashey, 2004). La calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$) es un marcador fluorescente que se une al calcio de estructuras biomineralizadas en huesos y otras estructuras esqueléticas (Diehl y Ellingboe, 1965; Sun *et al.*, 1992; Herrmann *et al.*, 2009). La calceína emite fluorescencia cuando es iluminada con luz ultravioleta y presenta baja toxicidad. Una vez aplicada, mediante baño o inyección, se une a cualquier estructura que este bajo un

proceso de calcificación, sin modificar la tasa de crecimiento en los individuos marcados (Rowley y Mackinnon, 1995; Lepore *et al.*, 2009).

En varios equinodermos se han marcado químicamente diferentes estructuras calcificadas que presentan incrementos periódicos de crecimiento, como los brazos de ofiuroideos (Rowley y MacKinnon, 1995), mandíbulas de erizos de mar (Brey *et al.*, 1995) y osículos de erizos de mar (Russell y Meredith, 2000). En otras especies se ha estimado el crecimiento de los individuos mediante el conteo de las bandas de diferentes grosores que se observan en los osículos de los brazos, y que reflejan distintos pulsos de calcificación en el crecimiento, los cuales se pueden relacionar con el tamaño del disco del cuerpo (Gage, 1990, 2003; Dahm, 1993). En el caso de *Ophiocten gracilis* se logró estimar la tasa de crecimiento relacionando el diámetro del disco y las marcas observadas en los osículos del brazo mediante microscopía electrónica de barrido (Gage, 2003).

Objetivos específicos

Estudiar el crecimiento de *O. januarii* mediante ensayos empleando marcadores químicos en laboratorio y en campo.

Estimar las tasas de crecimiento y desarrollar estudios de edad.

Evaluar la utilidad del conteo de bandas de calcificación en los osículos de los brazos bajo microscopía electrónica de barrido para la determinación de edad.

5.2 Metodología

Estudios de laboratorio

Durante el mes de agosto de 2007 se coleccionaron 150 ejemplares de *O. januarii* en el sitio de estudio (ver "Metodología general"), capturándose individuos con tallas mayores a 10 mm de diámetro de disco.

Se prepararon ocho acuarios con agua de mar artificial (10 litros cada uno) y se los dispuso en cámara fría con temperatura, aireación y fotoperiodo controlados. La salinidad se mantuvo constante (35 ppm) y la temperatura del agua entre 11 y 13 °C. El fotoperiodo se mantuvo en 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, mientras que la oxigenación de los acuarios se mantuvo constante a lo largo del ensayo. De los individuos capturados se seleccionaron 80 individuos sin evidente proceso de regeneración, a los cuales se les midió el diámetro mayor del disco, y luego se distribuyeron 10 animales por acuario de manera tal que en cada uno las tallas promedio de los ejemplares fueran similares.

Con el fin de determinar las concentraciones y tiempos de exposición que sean efectivos para estudiar el crecimiento en esta especie se realizaron ensayos empleando calceína (Sigma-Aldrich). En cada acuario se aplicó un tratamiento diferente, ensayando a distintas condiciones de exposición y concentraciones del compuesto. Se evaluaron dos concentraciones (100 y 200 mg/l) durante distintos tiempos de exposición mediante inmersión (3 y 6 horas). Otro método de aplicación ensayado fue mediante inyecciones a través de las hendiduras de las bursas de los individuos. Las soluciones de inmersión e inyección fueron preparadas con agua de mar artificial. Dos tratamientos fueron controles para cada uno de los métodos de aplicación (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Tratamientos ensayados en los estudios de laboratorio correspondientes a los ocho acuarios.

Solución	Concentración (mg/l)	Método de aplicación	Tiempo (horas)	Número de animales
Calceína	100	inmersión	3	10
Calceína	100	inmersión	6	10
Calceína	200	inmersión	3	10
Calceína	200	inmersión	6	10
Calceína	100	inyección	1	10
Calceína	200	inyección	1	10
Control	0	inmersión	6	10
Control	0	inyección	1	10

Cada dos semanas se tomó una muestra de dos individuos de cada acuario y se analizó la presencia de marcas fluorescentes y se registró dónde aparecían las marcas (Fig. 5.1 A, B). De cada individuo se extrajo por disección vértebras de los brazos, mandíbulas, espinas, placas laterales, placas dorsales, placas ventrales y escudos radiales. Cada elemento fue tratado durante 15 minutos con hipoclorito de sodio al 5,25% para eliminar restos de tejidos y luego fue lavado con agua destilada para descartar los restos del hipoclorito de sodio. Finalmente se pegó con adhesivo comercial de fraguado rápido a base de cianoacrilato en un portaobjetos cada una de las distintas estructuras calcáreas.

Las estructuras que mejor representaron el crecimiento fueron incluidas en resina Epoxicure (Distaltec LY 554 y HL 554) (Fig. 5.1 C, D). Las muestras se colocaron cinco minutos en estufa a 40 °C para eliminar las burbujas y se dejó endurecer a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez incluidas las muestras se las lijó con lijas al agua (tamaño de grano: 280). Luego del lijado

se las pulió sobre planchas de vidrio con polvos Buehler de carburo de silicio (SiC) de 500, 800 y 1000 phi.

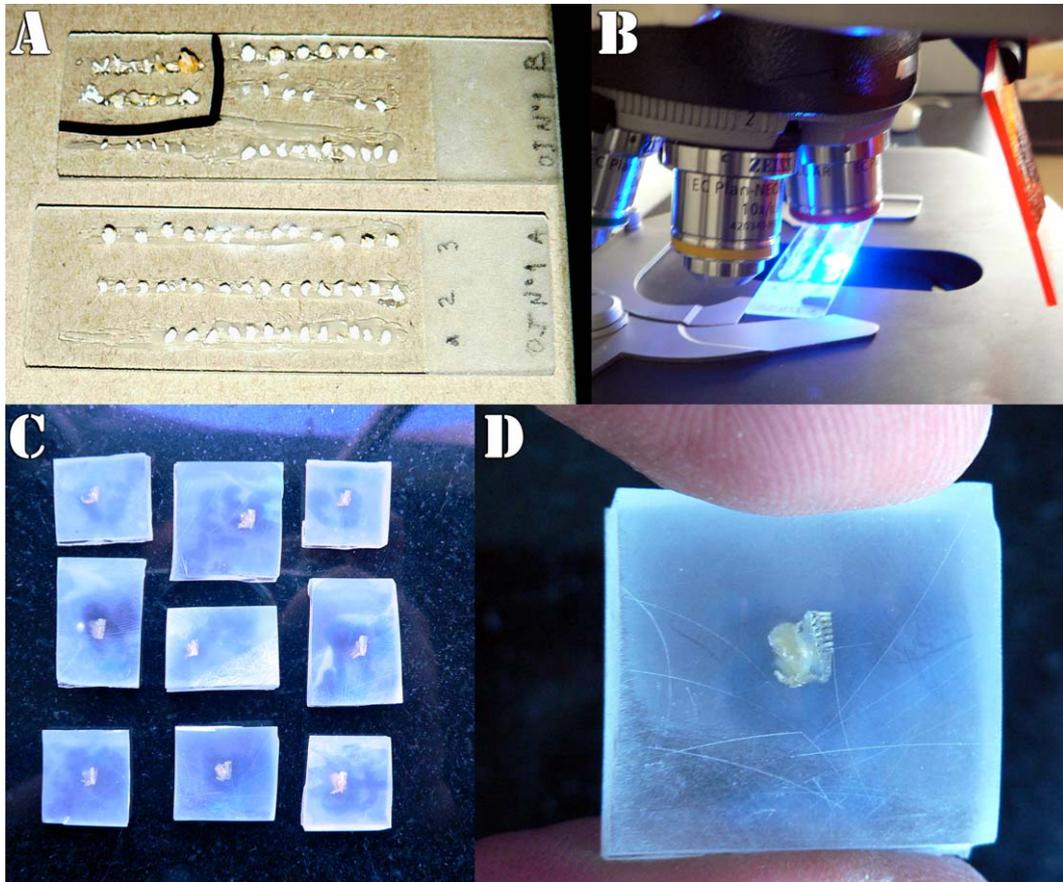


Figura 5.1. Identificación de estructuras marcadas con calceína. **A-** Montaje en portaobjetos de todas las estructuras. **B-** Localización de marcas con fluorescencia. **C-** Inclusión en resina de las estructuras con marcas. **D-** Detalle del lijado y pulido de las estructuras calcáreas.

Las muestras fueron analizadas empleando un microscopio Zeiss Axio Imager Z1 con filtros para epifluorescencia, irradiando con luz azul (450 a 490 nm). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital AxioCam HRc, anexa al microscopio, y las mediciones se realizaron de las imágenes tomadas usando el paquete de software Axiovision v.4.4.

Estudios a campo

El día 19 de enero de 2009 se realizó una captura de ofiuroides en la zona de estudio (ver “Metodología general”). Se coleccionaron todos los individuos posibles mediante un esfuerzo de muestreo de tres buzos durante 40 minutos de inmersión cada uno. Los individuos fueron marcados químicamente empleando la solución, método de aplicación, tiempos de exposición y concentraciones adecuadas según lo determinado en los estudios de laboratorio (Fig. 5.2).



Figura 5.2. Marcado químico y liberación de los individuos durante enero de 2009. **A-** Cubas empleadas durante el experimento. **B-** Individuos en baño de inmersión con calceína. **C-** Liberación posterior en el sitio de muestreo.

Con la finalidad de obtener información de crecimiento luego de medio año de estudio se realizó una recaptura limitada por tiempo en el lugar de estudio el día 8 de julio de 2009. Se coleccionaron todos los individuos posibles mediante un esfuerzo de muestreo de tres buzos durante 15 minutos de inmersión cada uno.

La recaptura al año de realizado el marcado químico se realizó el día 15 de enero de 2010. Durante la misma se empleó el mismo esfuerzo de muestreo que el inicial y se capturaron todos los animales posibles.

A cada individuo recapturado a los seis meses y al año se le midió el diámetro del disco y se realizó la disección de la estructura que mejor representa el crecimiento según lo observado en el estudio de laboratorio. Las mismas fueron incluidas en resina sobre bandejas plásticas y empleando un minitorno se lijó la mitad de la estructura con el fin de determinar aquellos individuos efectivamente marcados (individuos recapturados) bajo luz de fluorescencia. Las estructuras de los individuos marcados fueron nuevamente incluidas en resina, lijadas y pulidas con la finalidad de realizar las mediciones de crecimiento (Fig. 5.3).

Página siguiente: **Figura 5.3.** Identificación de los individuos recapturados marcados. **A-** Numeración y medición de cada individuo. **B-** Disección de las estructuras. **C-** Montado individual para cada individuo recapturado. **D-** Inclusión en resina. **E-** Lijado con minitorno. **F-** Detalle de las estructuras lijadas para reconocimiento de marcas de calceína.

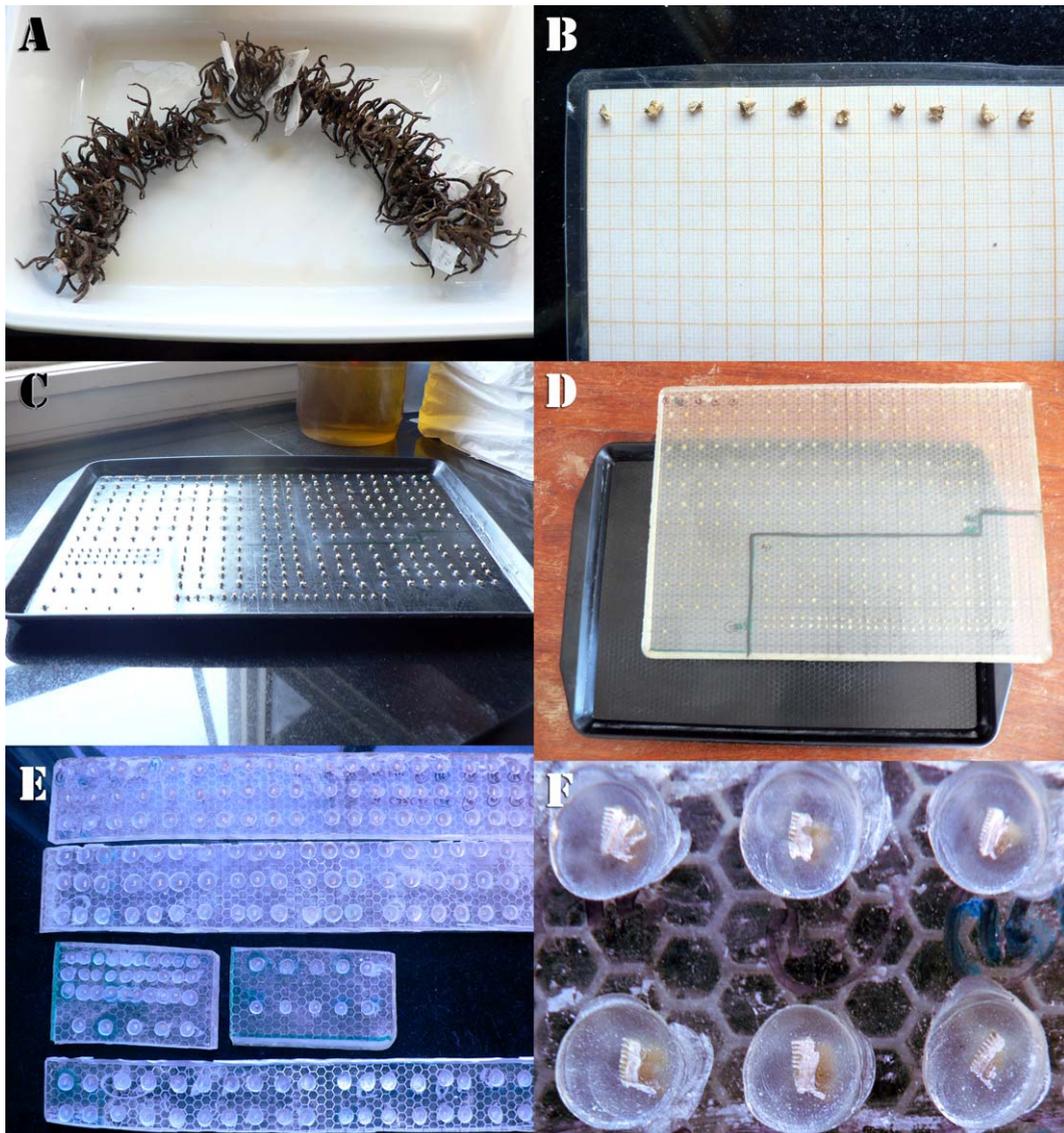


Figura 5.3.

Las muestras fueron analizadas empleando un microscopio Zeiss Axio Imager Z1 con filtros para epifluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital AxioCam HRc, anexa al microscopio, y las mediciones se realizaron de las imágenes tomadas usando el paquete de software Axiovision v.4.4.

Análisis de datos de crecimiento por incremento de tallas

Uno de los modelos de crecimiento más aplicados para describir el crecimiento en invertebrados es el especializado de von Bertalanffy:

$$L_t = L_\infty * (1 - e^{-K(t-t_0)}) \quad (5)$$

Dónde L_∞ es la talla alcanzada luego de un tiempo infinito de crecimiento, K define la velocidad de crecimiento y t_0 es la edad a la cual la talla es cero.

Un simple par de datos de incremento de tallas consiste en la talla L_t a tiempo t y la subsiguiente medición de talla L_{t+1} en un individuo, empleando, por ejemplo, experimentos de marcado y recaptura. Si las distancias x de subsecuentes medidas de tallas L_t y L_{t+x} son constantes, por ej. un año, los parámetros del modelo de crecimiento de von Bertalanffy pueden ser analizados mediante una transformación lineal de los parámetros siguiendo el método de Ford-Walford, obteniéndose:

$$L_{t+1} = a + b * L_t \quad (6)$$

Pudiéndose resolver para los parámetros L_∞ y K como:

$$K = -\ln(b) \quad (7)$$

$$L_\infty = a/(1-b) \quad (8)$$

Entonces los parámetros L_∞ y K son estimados directamente de la pendiente y la ordenada al origen de la regresión lineal.

Se estimaron los parámetros poblacionales de crecimiento L_∞ y K a partir de las mediciones de los incrementos de crecimiento en el tiempo, para las recapturas a los 6 y 12 meses. Se empleó el paquete FiSAT II para evaluar

variaciones en el crecimiento estacional y para estimar las edades de los individuos. Empleando las planillas de Microsoft Excel confeccionadas por Brey (2001) se estimó cual es la función de crecimiento que mejor ajusta a la población estudiada.

Estudios de microscopía electrónica de barrido

Con el fin de determinar la existencia de incrementos periódicos de crecimiento en los osículos vertebrales de los brazos se analizaron al microscopio electrónico de barrido (MEB) las vértebras correspondientes a tres individuos de distintas tallas de diámetro de disco recapturados luego de un año y que presentaban marcas fluorescentes de calceína. Los osículos fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio para eliminar los restos de tejidos y montados para MEB.

5.3 Resultados

5.3.1 Estudios de laboratorio

Todos los individuos marcados con calceína presentaron una marca verde fluorescente evidente en distintos tipos de osículos (Fig. 5.4). Sin embargo se observó que varias estructuras del mismo tipo no necesariamente calcifican al mismo tiempo. Las marcas de calceína fueron similares tanto para los baños como para las inyecciones, y para todas las concentraciones y tiempos de exposición estudiados. Las mismas fueron detectadas desde la segunda semana, resultando una técnica rápida de marcado químico.

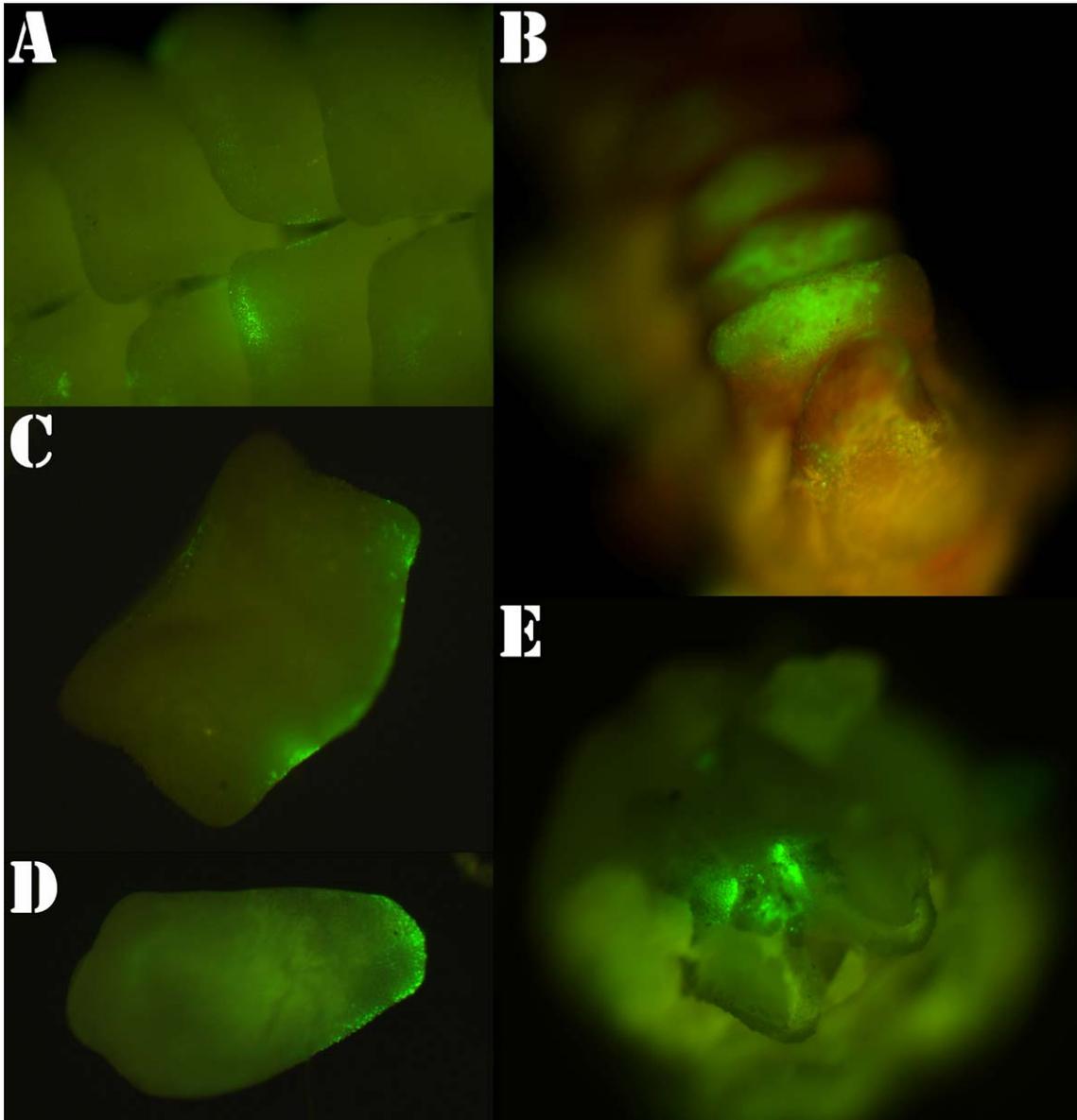


Figura 5.4. Diferentes estructuras marcadas luego de los estudios de laboratorio. **A-** Placas dorsales. **B-** Dientes y mandíbula. **C-** Placa ventral. **D-** Espina. **E-** Vértebra.

De los animales marcados, el 93% presentó marcas en las mandíbulas (Tabla 5.2). Estas marcas fueron conspicuas y bien definidas para la mayoría de los ejemplares marcados. En condiciones de laboratorio, transcurridos dos meses y medio, y aún sin alimento, el 10% de los animales presentaron un crecimiento medible más allá de la línea fluorescente en los dientes (Fig. 5.5).

La tasa de mortalidad del experimento fue muy baja, registrándose únicamente la pérdida de un individuo.

Tabla 5.2: Resultados observados sobre la presencia de marcas fluorescentes de los tratamientos.

Solución	Concentración (mg/l)	Método de aplicación	Tiempo (horas)	Núm. de animales	Marca (%)	Marca en mandíbula	Mortalidad (%)
Calceína	100	inmersión	3	10	100	100	0
Calceína	100	inmersión	6	10	100	100	0
Calceína	200	inmersión	3	10	100	100	0
Calceína	200	inmersión	6	10	100	80	10
Calceína	100	inyección	1	10	100	100	0
Calceína	200	inyección	1	10	100	80	0
Control	0	inmersión	6	10	0	0	0
Control	0	inyección	1	10	0	0	0

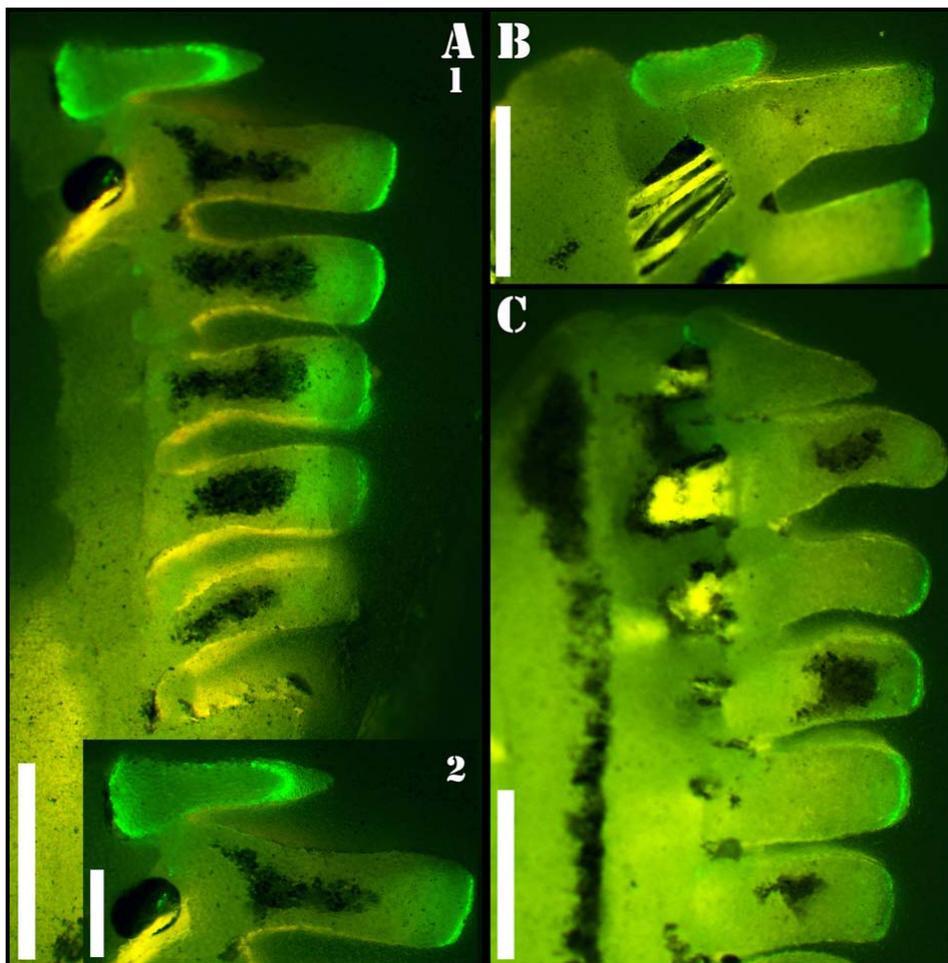


Figura 5.5. Crecimiento de los dientes. **A-** 1, Mandíbula con crecimiento en los primeros dientes. 2, Detalle donde se observa el crecimiento del “diente 0”. **B-** Otro individuo con crecimiento en los primeros dientes. **C-** Crecimiento en los dientes medios. Barras de escala: todas =500 µm, excepto A2 = 200 µm.

El alto porcentaje de marcas en mandíbulas y la posibilidad de realizar mediciones de los incrementos de crecimiento en las mismas (de los dientes y de la placa dental) señalan la factibilidad de emplear esta estructura como indicadora de crecimiento en la especie. En la Figura 5.6 se muestran las distintas partes de la mandíbula y su interpretación en los cortes empleando resina.

Página siguiente: **Figura 5.6.** Detalle de las estructuras que se observan en las mandíbulas incluidas en resina. **A-** Mandíbula antes de ser incluida. **B-** Las distintas partes de la mandíbula. 1, Placa oral. 2, Placa dental. 3, Dientes. **C-** Mandíbula incluida en resina después del lijado y pulido. **D-** 1, Vista de C bajo el microscopio de fluorescencia (mandíbula sin marcar). 2, Esquema de las partes que se reconocen; placa oral (blanco), placa dental (rojo), dientes (azul) y zonas de musculatura (verde). Barras de escala: todas =500 μm .

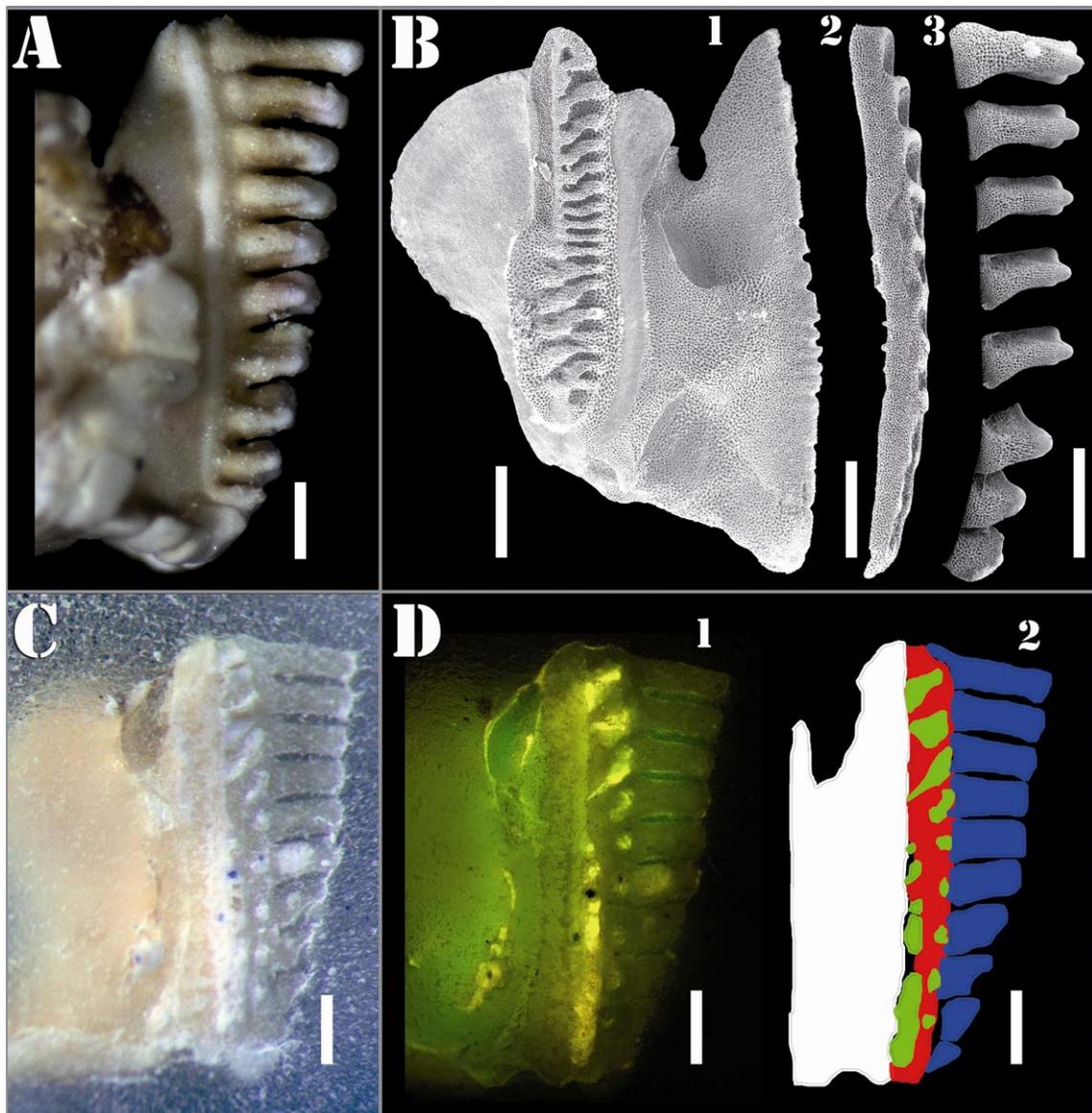


Figura 5.6.

5.3.2 Estudios en campo

Durante la recaptura a los seis meses (muestreo de invierno) se coleccionaron 225 individuos, de los cuales 10 presentaron marcas de calceína (4,4%). El porcentaje de recaptura fue mayor al año, coleccionándose 645 individuos de los cuales 40 presentaron marcas fluorescentes (6,2%). Del total de ejemplares marcados inicialmente (720 individuos) fue posible recapturar

cerca del 7% durante ambos muestreos. La distribución de frecuencias de tallas los individuos fue similar en las dos recapturas (Fig. 5.7).

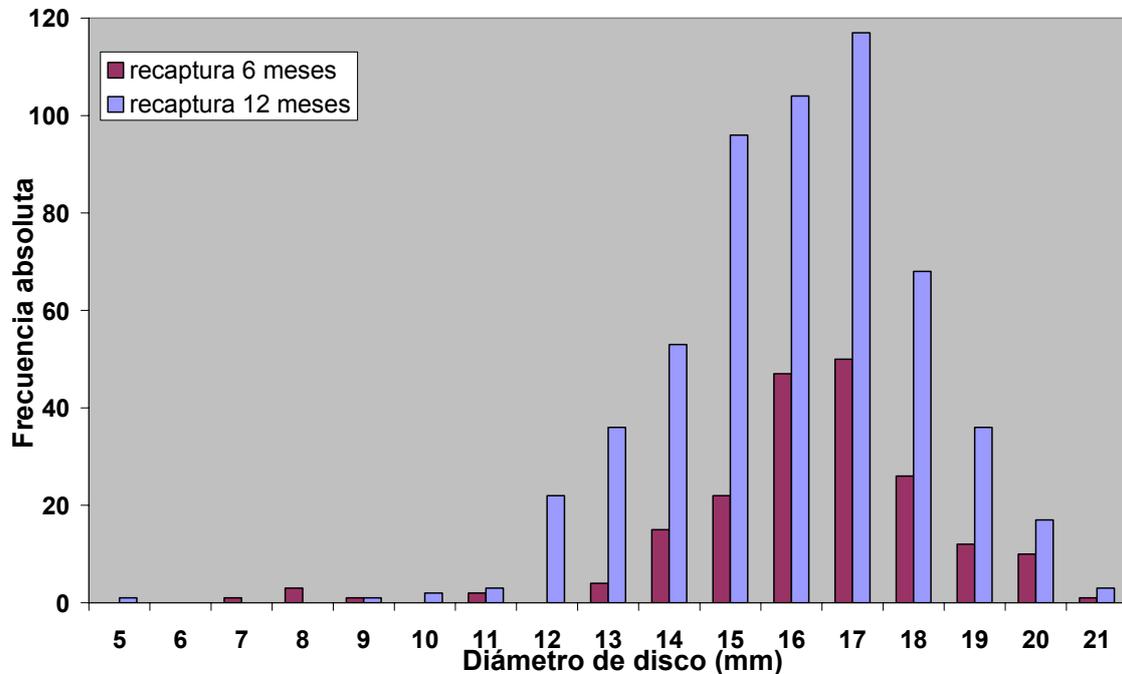


Figura 5.7. Frecuencia absoluta del número de individuos en función de los diámetros del disco para los individuos recapturados a los seis meses (N = 225) y al año (N = 645).

Luego de procesados los animales, fue posible reconocer áreas de crecimiento más allá de las marcas de calceína (Fig. 5.8). Las marcas fluorescentes registran el tamaño de las mandíbulas el día de marcado, evidenciado en las placas orales, la placa dental y los dientes.

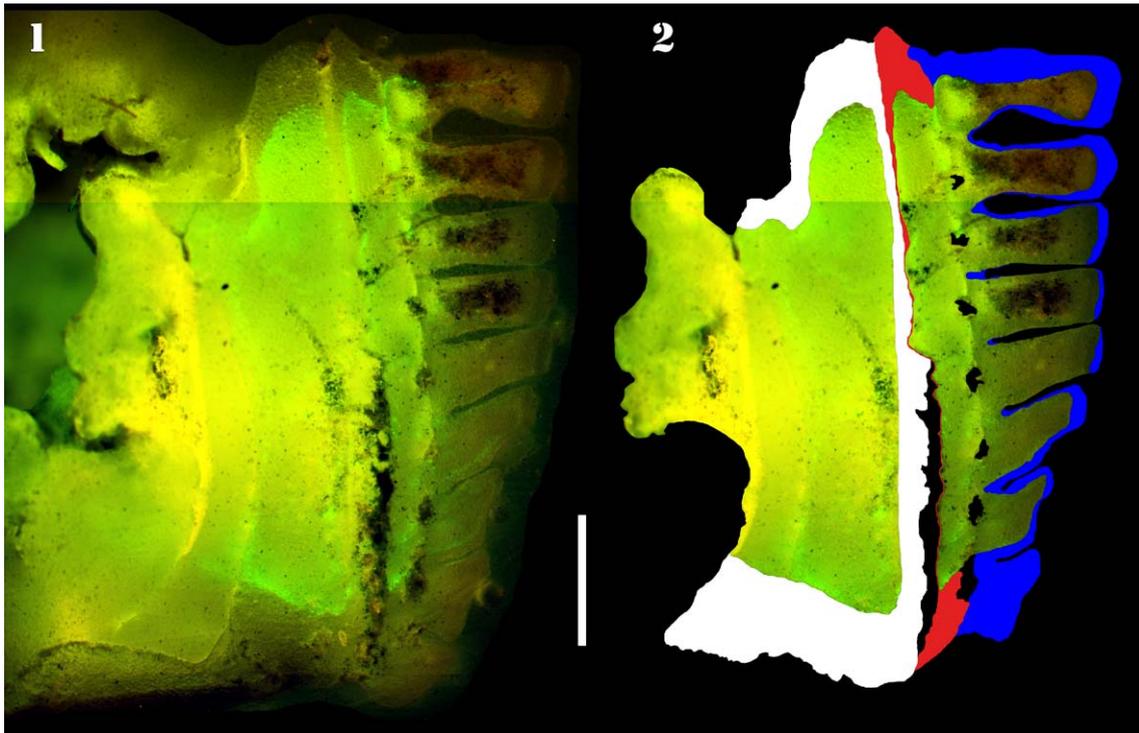


Figura 5.8. Corte de una mandíbula de un ejemplar recapturado después de un año. 1, La vista que se tiene al microscopio mediante epifluorescencia; se observan las marcas de calceína de color verde fluorescente. 2, Esquema de la misma mandíbula donde se indican las zonas que crecieron después de la línea de calceína; crecimiento de la placa oral (en blanco), crecimiento de la placa dental (en rojo) y crecimiento de los dientes (en azul). Barra de escala: =500 μ m.

Tanto en los ejemplares recapturados al año (Fig. 5.9) como en los recapturados a los seis meses (Fig. 5.10) se observó que los individuos más chicos presentan una tasa de crecimiento mayor que los más grandes. Esto se evidencia mediante una mayor zona de crecimiento posterior a las marcas de calceína en los pequeños.

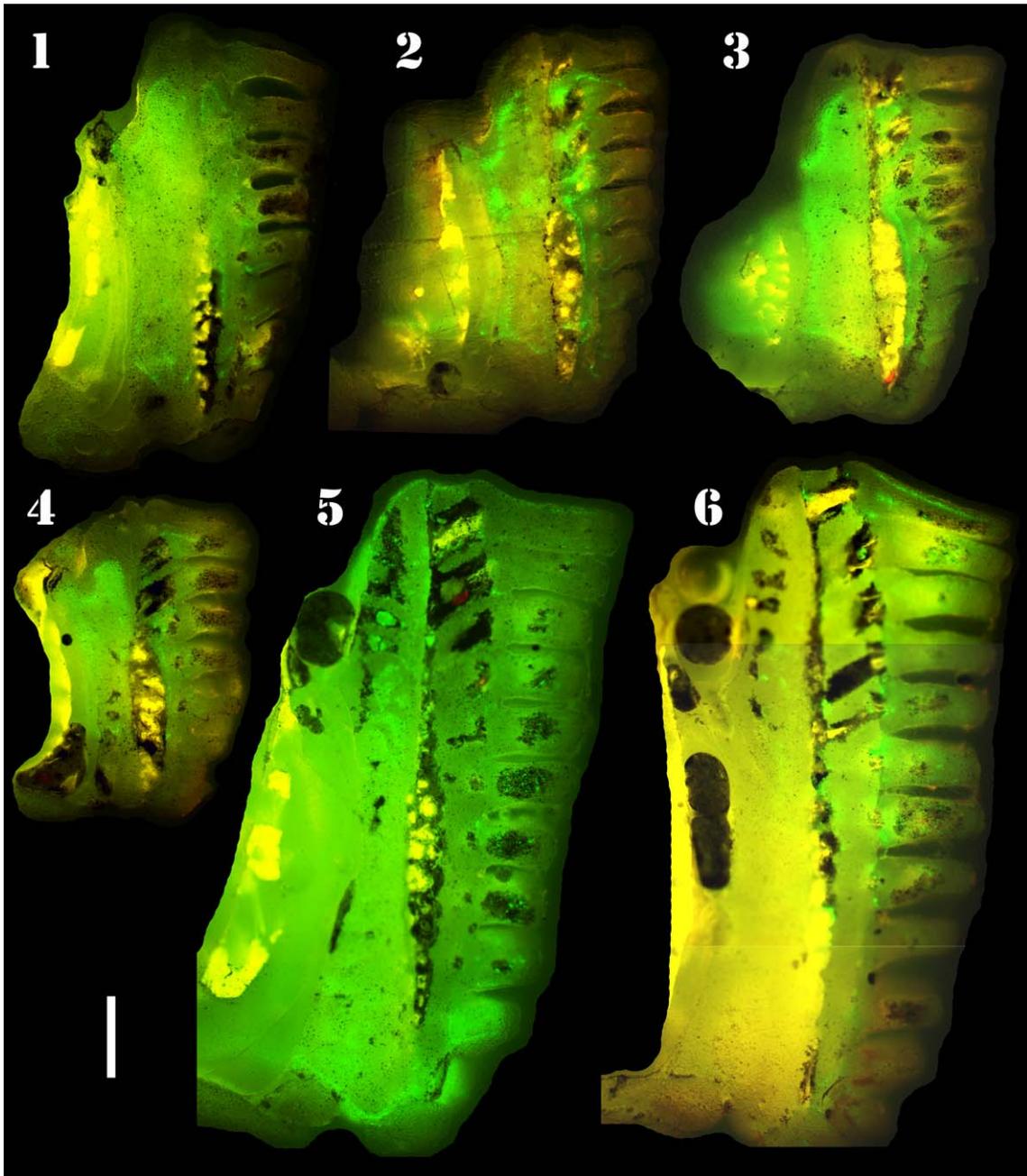


Figura 5.9. Cortes de las mandíbulas de ejemplares recapturados después de un año. 1, Ejemplar de 13,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 2, Ejemplar de 11,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 3, Ejemplar de 11,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 4, Ejemplar de 9,5 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 5, Ejemplar de 19,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 6, Ejemplar de 19,5 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. Barra de escala: =500 μ m.

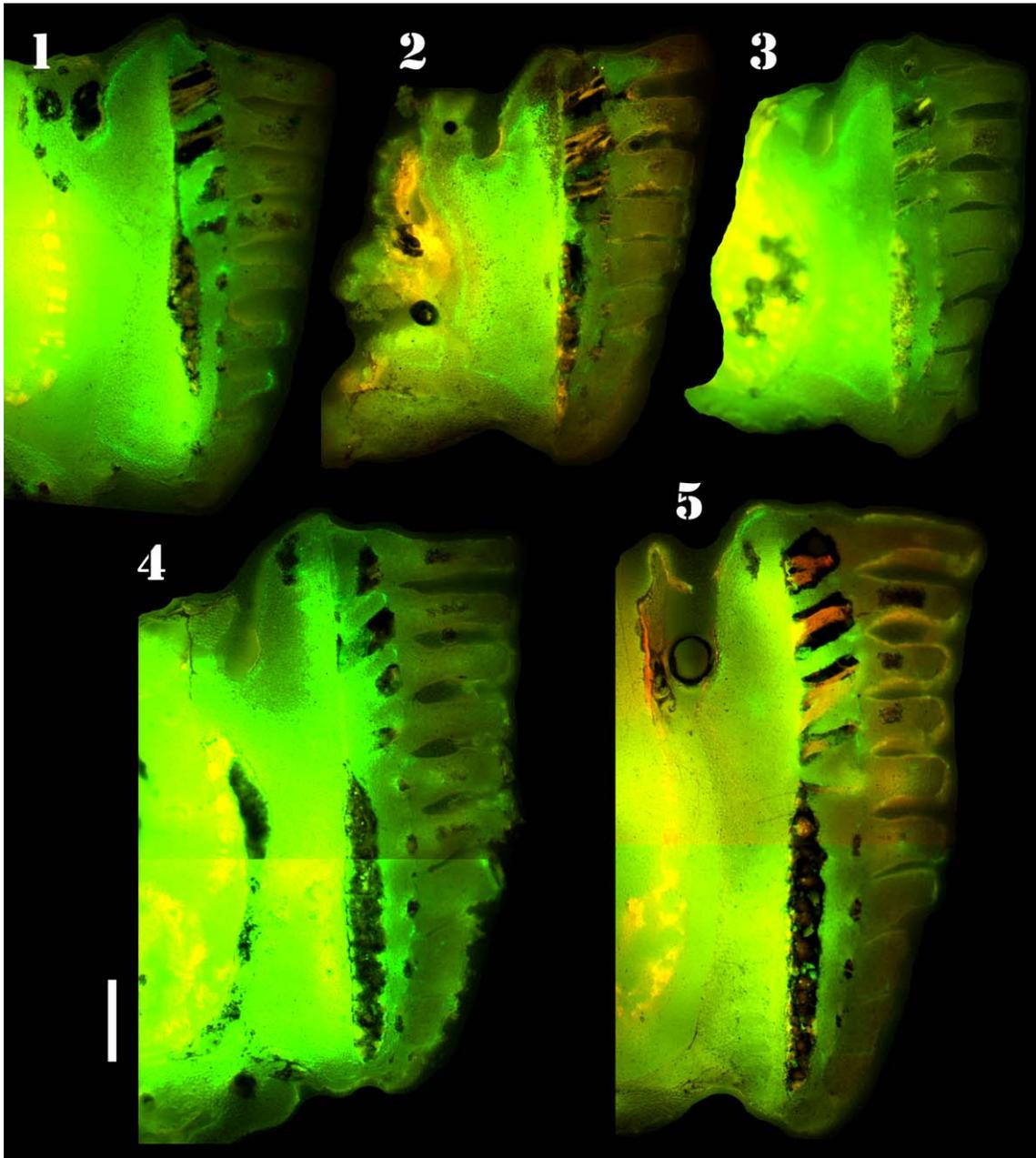


Figura 5.10. Cortes de las mandíbulas de ejemplares recapturados después de seis meses. 1, Ejemplar de 13,6 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 2, Ejemplar de 11,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 3, Ejemplar de 11,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 4, Ejemplar de 17,0 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. 5, Ejemplar de 17,3 mm de diámetro de disco en el momento de la recaptura. Barra de escala: =500 μ m.

Se observó tanto crecimiento dorsal como ventral para todas las mandíbulas. En algunos casos también se pudo evidenciar mediante marcas fluorescentes la zona de sutura entre las dos partes que forman la placa oral (e.g., Fig. 5.10 mandíbula 2).

Empleando las ecuaciones referidas en la sección de “Morfología” (ecuaciones 1, 2, 3 y 4) fue posible transformar las mediciones del largo de la placa dental y de los dientes a medidas de tamaño corporal (diámetro del disco). De esta manera se obtuvieron las tallas estimadas iniciales y finales para cada individuo recapturado (Tabla 5.3).

Página siguiente: *Tabla 5.3*: Diámetros de disco medidos y estimados para los individuos recapturados.

Tabla 5.3.

Recaptura 12 meses				Recaptura 6 meses			
Individuo	Diámetro (mm)			Individuo	Diámetro (mm)		
N°	Medido final	Estimado final	Estimado inicial	N°	Medido final	Estimado final	Estimado inicial
1	17,9	17,9	17,0	1	15,3	sin dato	sin dato
2	13,4	14,3	13,6	2	17,0	16,7	16,2
3	16,6	16,4	16,0	3	17,3	17,7	17,0
4	19,0	18,9	18,5	4	15,1	17,0	16,5
5	17,0	18,9	18,4	5	17,2	17,1	16,8
6	15,0	15,0	14,1	6	18,1	18,8	18,3
7	17,2	16,6	16,0	7	14,8	14,3	14,1
8	15,8	14,7	13,8	8	15,0	15,4	14,7
9	15,0	15,0	14,1	9	11,0	11,5	9,6
10	20,5	18,3	17,5	10	13,6	13,5	12,2
11	17,0	17,3	16,8				
12	19,5	19,6	19,0				
13	15,0	15,5	14,4				
14	17,5	17,9	17,6				
15	15,0	15,4	14,3				
16	16,0	14,4	13,2				
17	19,0	19,5	19,1				
18	16,0	15,4	14,0				
19	20,0	20,4	19,9				
20	17,0	16,3	15,9				
21	11,0	11,4	7,8				
22	11,0	11,3	8,2				
23	9,5	8,7	5,6				
24	18,3	18,5	17,3				
25	16,0	17,2	16,3				
26	18,0	18,1	17,9				
27	16,1	15,9	15,2				
28	16,7	17,5	16,7				
29	16,9	16,3	16,0				
30	16,3	17,6	17,4				
31	15,0	14,6	13,7				
32	13,4	10,9	8,2				
33	14,5	16,1	15,9				
34	13,5	13,6	12,8				
35	14,9	14,7	14,0				
36	13,3	13,4	12,2				
37	12,2	12,0	10,0				
38	14,1	13,7	12,7				
39	12,2	11,6	9,9				
40	13,0	12,7	9,4				

Al comparar los diámetros de disco finales medidos de los individuos y los estimados a partir de las mediciones de las partes mandibulares se observa un buen ajuste ($R^2 = 0,8927$) (Fig. 5.11).

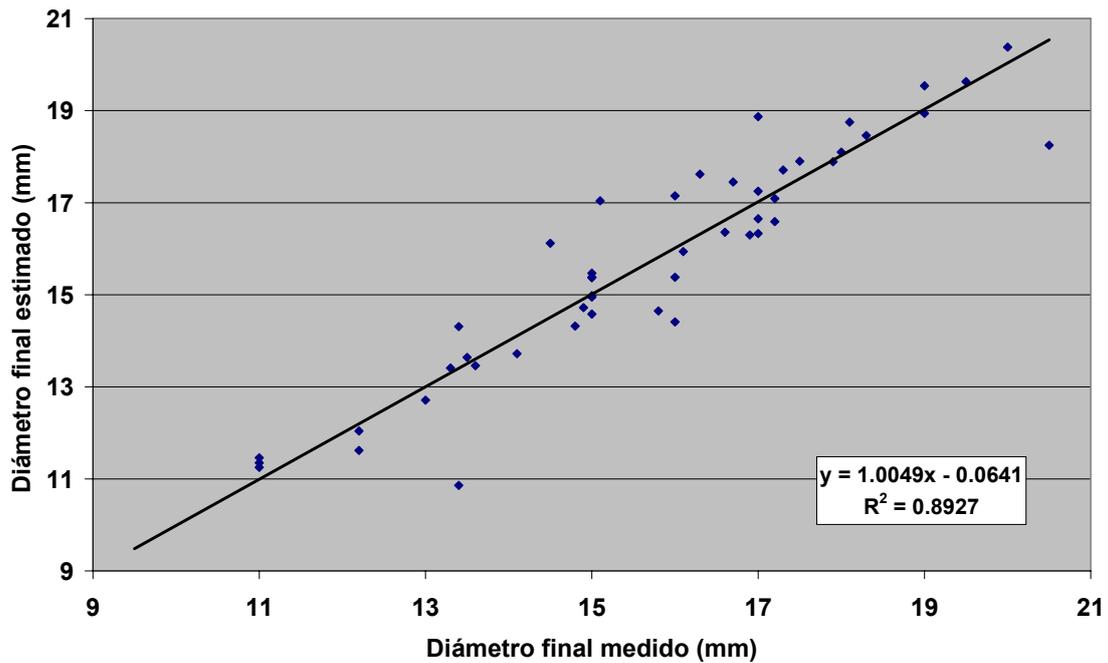


Figura 5.11. Correspondencia entre las tallas medidas de los individuos recapturados y las tallas estimadas a partir de las conversiones a talla de las mediciones de las placas dentales y dientes.

Los máximos incrementos de crecimiento se observaron en los ejemplares más chicos de *O. januarii*. Al graficar las tallas estimadas iniciales y finales para todos los individuos recapturados al año (Figura 5.12) se puede observar que los ofiuroideos más chicos presentan un mayor crecimiento que los más grandes. El crecimiento individual diario dado por el diámetro del disco estuvo entre $0,5 \mu\text{m d}^{-1}$ y $10,2 \mu\text{m d}^{-1}$.

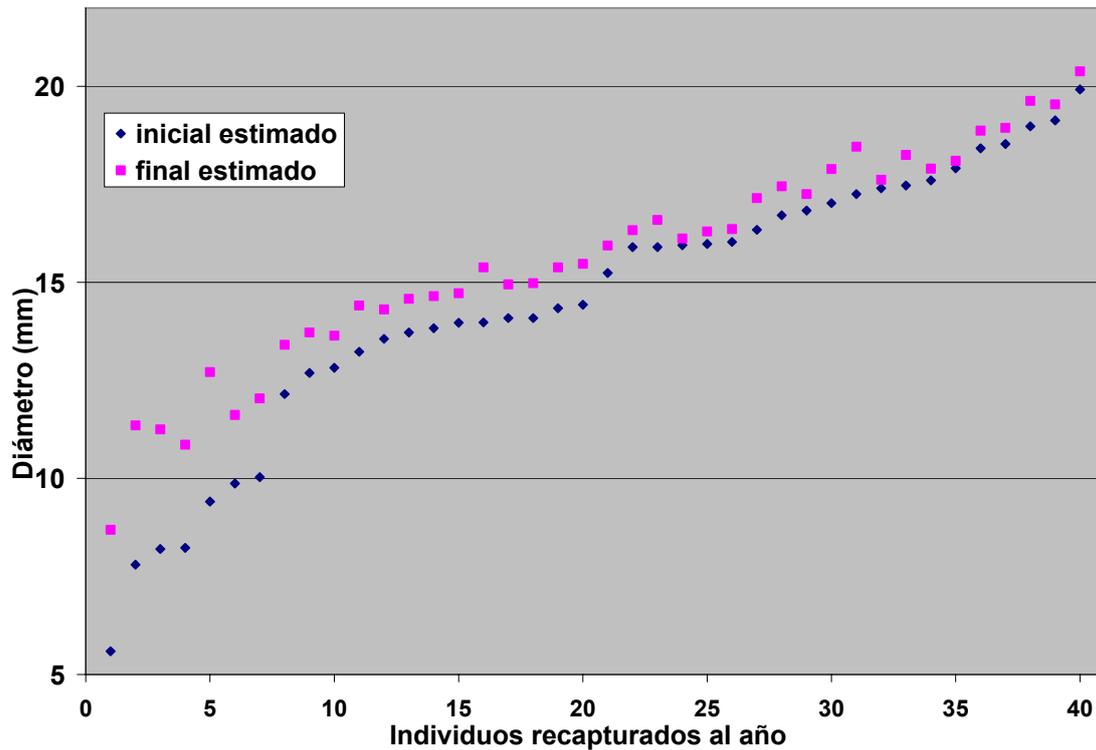


Figura 5.12. Gráfico de los incrementos en el diámetro del disco estimados para los individuos recapturados luego de un año. En el eje x se disponen los individuos en orden creciente de tallas iniciales estimadas.

5.3.3 *Análisis de datos de crecimiento por incremento de tallas*

Cuando se grafican las tallas finales estimadas en función de las tallas iniciales estimadas, es posible relacionar ambas mediciones y obtener de la regresión lineal los parámetros poblacionales K y L_{∞} (Fig. 5.13 y Fig. 5.14).

Página siguiente: **Figura 5.13.** Gráfico donde se relaciona los valores iniciales y finales de los diámetros del disco estimados para los individuos recapturados luego de un año. La recta punteada indica la situación de crecimiento cero (es decir, cuando la talla inicial es igual a la final).

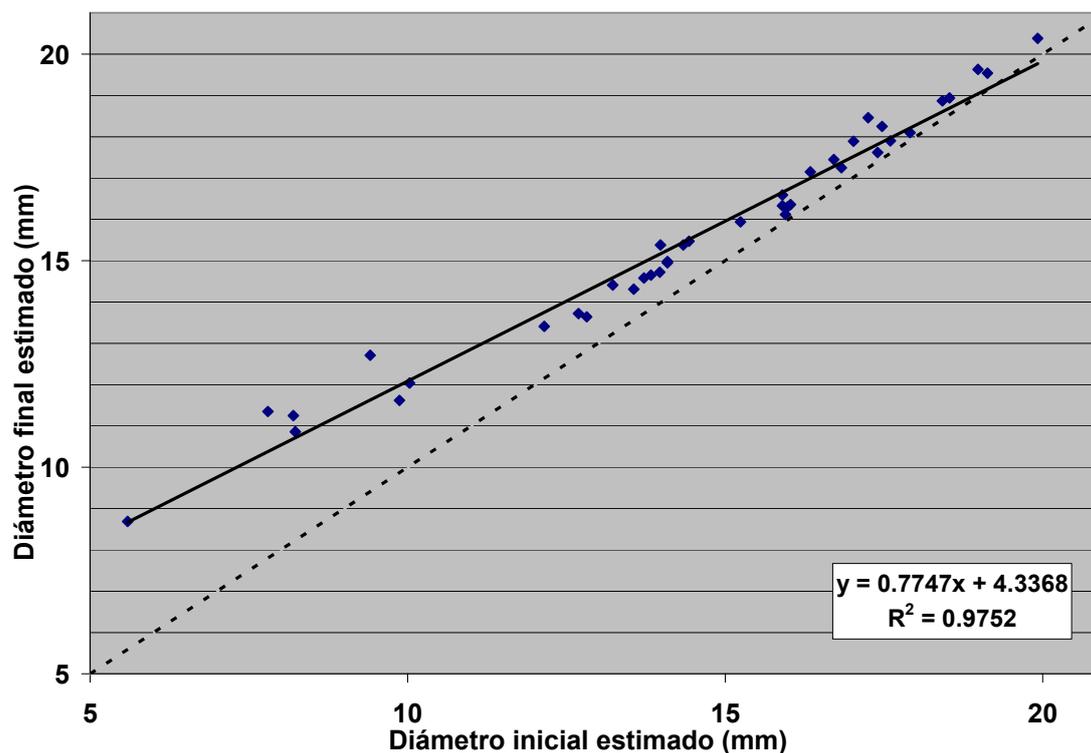


Figura 5.13.

Mediante el análisis gráfico de Ford-Walford se obtiene un valor aproximado de $L_{\infty} = 19,5$ mm, para el crecimiento estimado al año. Este valor corresponde al punto en que la recta de regresión lineal de los valores observados corta la recta de crecimiento cero. Empleando las fórmulas derivadas de la ecuación de von Bertalanffy (ecuaciones 7 y 8) se calculan los valores precisos de $L_{\infty} = 19,25$ mm y $K = 0,255$ año⁻¹, para el crecimiento anual.

Página siguiente: **Figura 5.14.** Gráfico donde se relaciona los valores iniciales y finales de los diámetros del disco estimados para los individuos recapturados luego de seis meses. La recta punteada indica la situación de crecimiento cero.

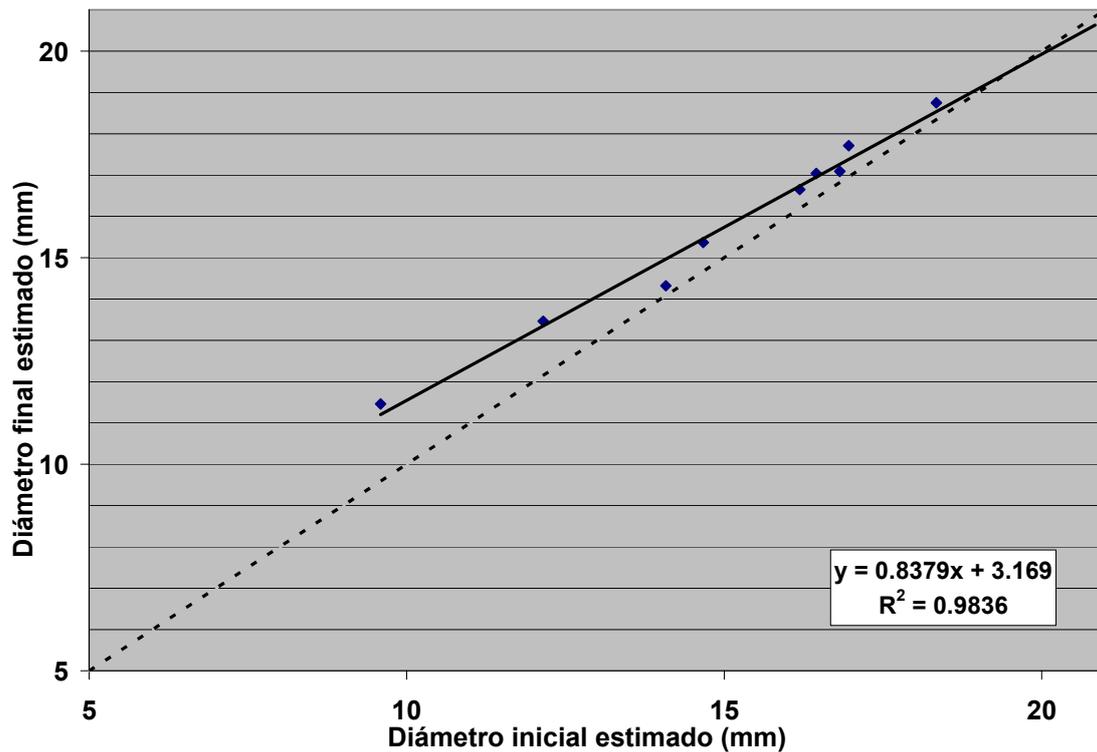


Figura 5.14.

Para el crecimiento estimado mediante el análisis gráfico de Ford-Walford de los ejemplares recapturados a los seis meses se obtiene un valor aproximado de $L_{\infty} = 19,5$ mm. Empleando las fórmulas derivadas de la ecuación de von Bertalanffy se calculan los valores precisos de $L_{\infty} = 19,55$ mm y $K = 0,177$ año⁻¹.

Las diferencias observadas en el valor de K para el crecimiento a los seis meses de iniciado el ensayo y al año están dadas por la presencia de individuos más chicos, con tasas de crecimiento mayores, en la recaptura al año.

Ejecutando la rutina SOLVER de las planillas de Excel, se obtienen los valores poblacionales $L_{\infty} = 20,38$ mm y $K = 0,219$ año⁻¹, siendo la función de crecimiento que mejor ajustó a los parámetros computados la tipo especial de

von Bertalanffy ($R^2 = 0,973$). Empleando el valor de L_∞ así calculado, se obtuvo mediante en análisis de Gulland y Holt (1965) para el total de los individuos recapturados un valor de $K = 0,222 \text{ año}^{-1}$ (Fig. 5.15) (Tabla 5.4), observándose una ligera oscilación estacional en el crecimiento ($C < 0,40$).

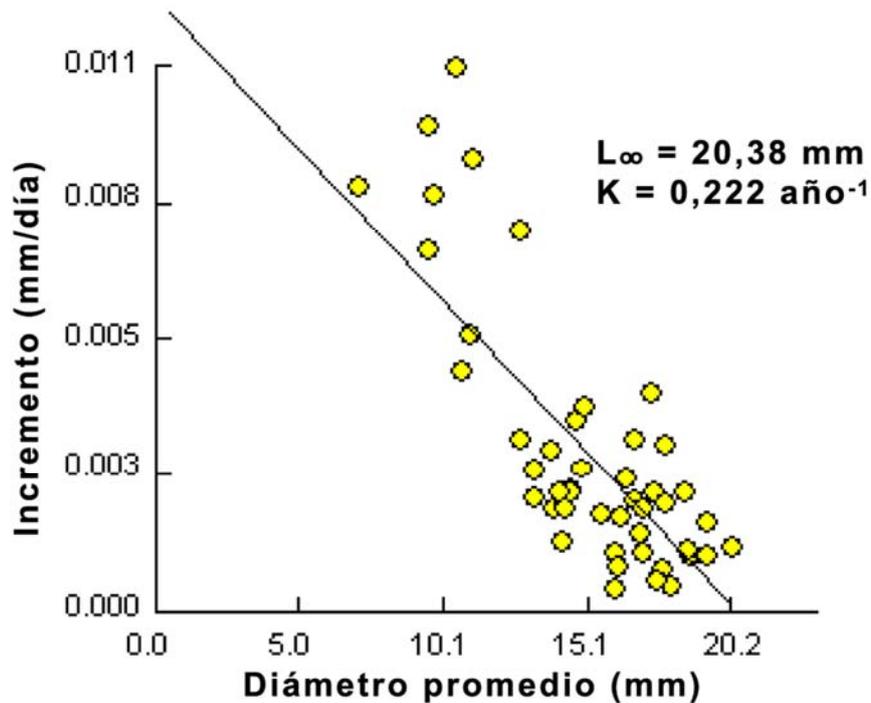


Figura 5.15. Análisis de Gulland y Holt para todos los individuos recapturados (incluyendo las recapturas a los 6 y 12 meses).

Empleando estos parámetros de crecimiento para todos los individuos recapturados se aplicó el método de Appeldoorn (1987), obteniéndose la edad de los individuos según las tallas ($r^2=0,7300$) (Fig. 5.16) (Tabla 5.4).

Página siguiente: **Figura 5.16.** Resultado del análisis de crecimiento para todos los individuos recapturados (incluyendo las recapturas a los 6 y 12 meses).

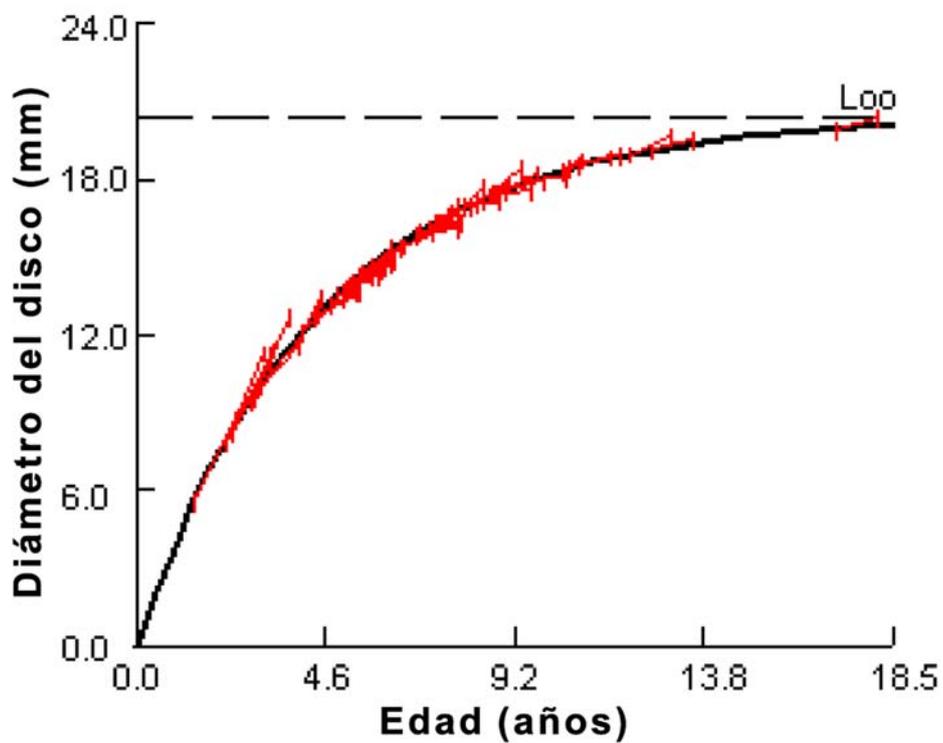


Figura 5.16.

Página siguiente: *Tabla 5.4*: Valores comparados de los parámetros poblacionales y edad para distintas especies.

Tabla 5.4.

Especie	K (año ⁻¹)	L _∞ (mm)	Edad máxima (años)	Referencia
<i>Ophiura Ijungmani</i>	0,101	14,8	10	Gage y Tyler, 1981; Gage, 1990
<i>Ophionotus hexactis</i>	0,079-0,160	43,8-27,6		Morrison, 1979
<i>Ophionotus victoriae</i>	0,248	32,0	22	Dahm, 1996; Grange <i>et al.</i> , 2004
<i>Ophioplocus incipiens</i>	0,176	44,6	19	Dahm, 1996
<i>Ophiura (Ophiuroglypha) lymani</i>	0,170	25,0	20	Dahm, 1999
<i>Ophioplinthus gelida</i>		21,0	33	Dahm, 1996
<i>Ophioplinthus brevirima</i>		21,0	25	Dahm, 1996
<i>Astrotoma agassizii</i>	0,012		91	Dahm, 1996
<i>Ophionereis annulata</i>	0,075	20,0		Medeiros-Bergen y Ebert, 1995
<i>Ophioplocus esmarki</i>	0,069	19,4		Medeiros-Bergen y Ebert, 1995
<i>Ophiocten gracilis</i>	0,380-0,073	8,2-20,8	7	Gage y Tyler, 1982; Gage, 2003
<i>Ophiocten hastatum</i>	0,202-0,632	20,4-14,9	10	Gage <i>et al.</i> , 2004
<i>Ophiura albida</i>	0,229	10,1	10	Dahm, 1993
<i>Amphiura chiajei</i>	0,373	9,1		Munday y Keegan, 1992
<i>Amphiura filiformis</i>	0,536	6,7	11	Josefson, 1995; Sköld <i>et al.</i> , 2001
<i>Ophiomusium lymani</i>	0,360	33,8	20	Gage y Tyler, 1982; Gage, 1990
<i>Ophiura ophiura</i>	0,084	27,7	11	Dahm, 1993
<i>Astrobrachion constrictum</i>		23,0	22	Stewart y Mladenov, 1997
<i>Stegophiura sp.</i>	0,078-0,188	38,8	15	Quiroga y Sellanes, 2009
<i>Ophioplocus januarii</i>	0,219-0,222	20,4	18	Presente estudio

5.3.4 Estudios de microscopía electrónica de barrido

No fue posible reconocer límites definidos en los pulsos de crecimiento que ocurren en los osículos vertebrales de los brazos en *O. januarii* (Fig. 5.17).

El estereoma de las caras proximales y distales de las vértebras se presenta de manera uniforme, sin un claro patrón de deposición que indique periodos de crecimiento más rápido o más lento.

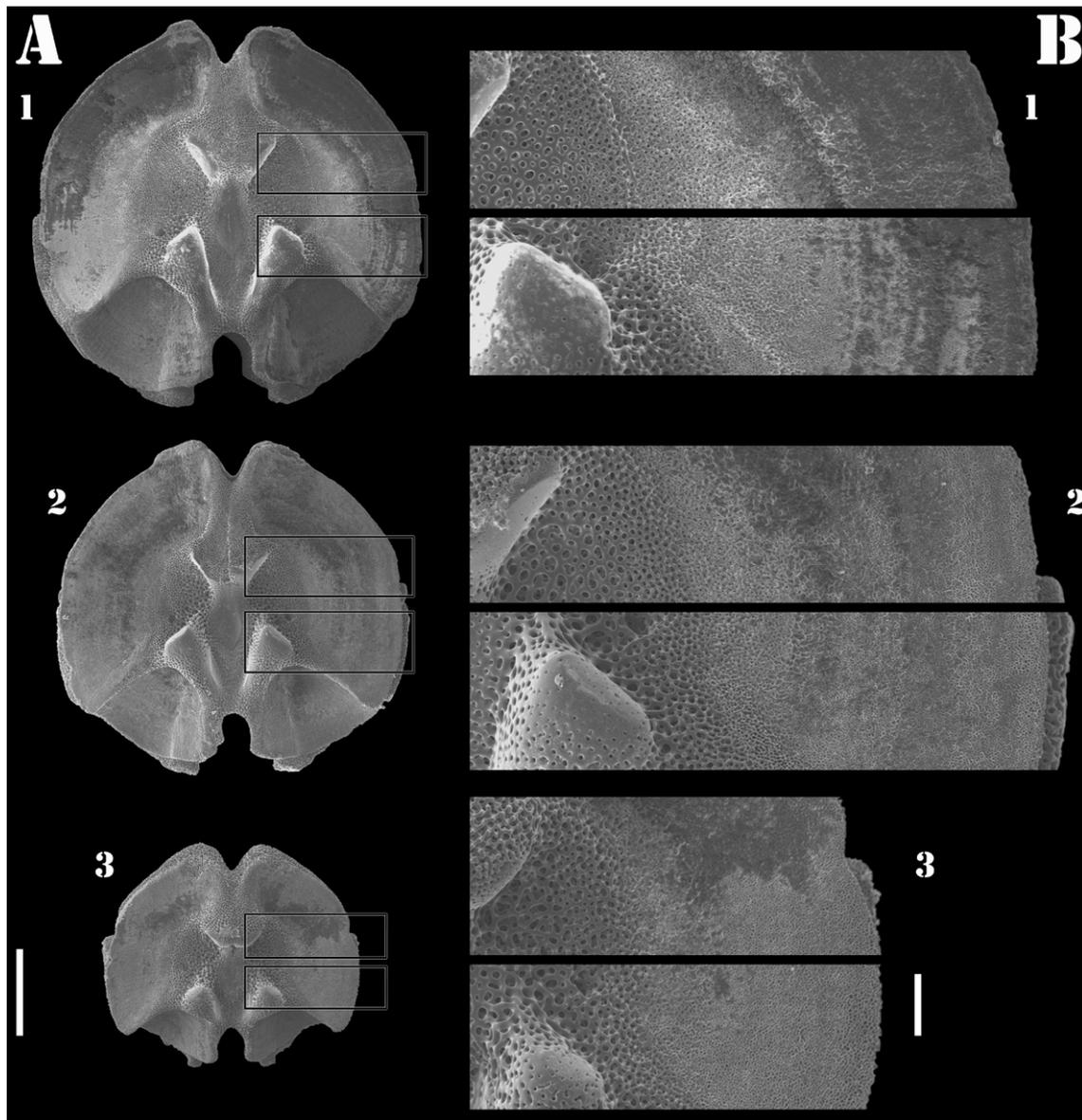


Figura 5.17. Análisis de bandas de crecimiento en osículos vertebrales de tres individuos. **A-** Cara proximal de las vértebras. **B-** Detalle de dos secciones del lado derecho de las vértebras. Barras de escala: A =500 μ m; B =100 μ m.

5.4 Discusión

La calceína ha demostrado ser un útil marcador químico para estudiar el crecimiento en *O. januarii*. Una vez incorporada en el esqueleto interno y expuesto a luz ultravioleta, emite una marca verde fluorescente. La incorporación del compuesto químico en estructuras calcáreas en crecimiento permite realizar estudios de crecimiento en esta especie. La estructura que mejor indica el crecimiento en *O. januarii* es la mandíbula. Medeiros-Bergen y Ebert (1995) realizaron ensayos empleando calceína en *Ophioplocus esmarki*, observando marcas de crecimiento en los escudos radiales, mientras que para *Ophionereis annulata* estas marcas fueron visibles en la mandíbula. Los datos observados para esta última especie revelaron dos marcas de calceína: la primera, fue en la zona donde el diente articula con la base de la mandíbula, y la segunda marca dentro del diente. Además del recién mencionado, existe sólo otro estudio para ofiuroides empleando calceína; Stewart (1995) observa marcas fluorescentes en los escudos radiales de *Astrobrachion constrictum*. Los escudos radiales de *O. januarii* no revelaron marcas de calceína para las concentraciones y tiempos testeados. Independientemente de la técnica de aplicación, ya sea baños o inyecciones, o de las concentraciones analizadas, es posible registrar marcas fluorescentes en los individuos sin afectar significativamente su supervivencia.

Ophioplocus januarii es la primera especie para la cual se ha registrado que el crecimiento mandibular ocurre tanto en sentido dorsal como ventral. En ambos sentidos se observaron crecimientos más allá de las marcas fluorescentes en las mandíbulas, lo cual confirma el crecimiento de las mandíbulas según lo expresado en la sección "Morfología". El aumento en el

número de dientes dorsales estaría dado por el abrupto crecimiento del diente 0, hasta alcanzar la longitud del diente 1, donde el crecimiento se desaceleraría. Una vez que el diente 0 en desarrollo alcanza al diente 1, el primero pasa a representar al diente 1 y el otro, diente 2 (según la nomenclatura propuesta en “Morfología”).

El porcentaje total de recaptura registrado en este estudio para *O. januarii* fue cercano al 7%. En estudios de crecimiento llevados a cabo por Russell y Meredith (2000) para el erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis* donde se aplicó captura, marcado y recaptura, se obtuvo un porcentaje de recaptura del 57%, mientras que trabajos realizados por Pomory y Lares (2000) para la estrella de mar *Luidia clathrata* han revelado porcentajes de recaptura de 2,17%.

La mayoría de los estudios de crecimiento en ofiuroides realizados al día de hoy se basan en la interpretación de anillos de crecimiento en los osículos vertebrales (e.g., Gage, 1990; Dahm, 1993, 1996; Gage *et al.*, 2004; Quiroga y Sellanes, 2009). En estos estudios se asume que el patrón de bandas de crecimiento refleja variaciones en la tasa de crecimiento estacional, observándose zonas oscuras de rápido crecimiento (dado por un estereoma más poroso) seguidas de zonas más claras de crecimiento más lento (dado por una mayor compactación del estereoma), interpretándose como pulsos anuales de crecimiento. Sin embargo, Dahm (1993) reconoce un error de lectura en las primeras bandas de crecimiento en los ofiuroides más grandes debido a una superposición de crecimiento de la parte central de las vértebras, debiendo corregir la información basándose en observaciones de ejemplares más chicos. Russel y Meredith (2000) comprobaron mediante técnicas de marcado químico

en erizos de mar que existe una subestimación de la edad cuando se analizan las líneas naturales de crecimiento, no siendo los osículos de erizos de mar indicadores fiables de la edad. Para *O. januarii* no es posible reconocer variaciones estacionales en el crecimiento; la pequeña oscilación estacional observada estaría dada por la mayor representación de tallas menores (correspondientes a individuos con mayor tasa de crecimiento relativa) en la recaptura al año de estudio y no a una temporalidad en el crecimiento. Adicionalmente, en el presente estudio no fue posible reconocer bandas naturales de crecimiento en las vértebras de *O. januarii*, lo cual indicaría que esta especie tiene un crecimiento constante en el tiempo. Aún no se han realizado estudios que permitan validar la asunción que el bandeo de las vértebras corresponda a señales naturales de crecimiento correspondientes a marcas anuales. Para ello es necesario identificar alguna especie que presente tal bandeo y a la vez presente, por ejemplo, marcas fluorescentes en estudios de crecimiento empleando calceína (Campana, 2001) o mediante estudios de análisis de isótopos estables.

El modelo de crecimiento teórico que mejor se ajusta al crecimiento de la población estudiada es el especial de von Bertalanffy. La información de las tasas de crecimiento de los juveniles e incremento en el diámetro del disco de los adultos sugieren que el crecimiento en *O. januarii* es relativamente rápido inicialmente y que luego lentamente disminuye hasta que se aproxima a la talla máxima, como se observó en la curva de crecimiento calculada empleando los datos de campo. De acuerdo a los datos de incrementos de crecimiento aquí analizados, *O. januarii* alcanzaría en la zona de estudio una edad cercana a los 18 años con una talla de diámetro de disco aproximadamente de 20,4 mm. En

el presente estudio se registró una talla máxima de 20,7 mm (ver “Morfología”) y según otros autores los individuos de esta especie pueden alcanzar los 25 mm (Bernasconi y D’Agostino, 1977; Bartsch, 1982), con lo cual la edad máxima puede llegar a ser mayor o puede ser que las tasas de crecimiento sean mayores en otras zonas. La tasa de crecimiento aquí reportada presenta valores intermedios a las tasas de crecimiento registradas para otras especies (Tabla 5.4). La especie cogenérica *Ophioplocus incipiens* presenta lento crecimiento, pero alcanza el doble de la talla máxima que *O. januarii* a una edad máxima similar (Dahm, 1996). Por su parte, *Ophioplocus esmarki* también presenta un crecimiento muy lento, aún cuando su talla máxima es similar a la calculada para *O. januarii* (Medeiros-Bergen y Ebert, 1995).

El crecimiento individual de las especies de invertebrados bentónicos puede ser extremadamente variable, principalmente debido a factores ambientales como la temperatura y/o disponibilidad de alimento (Brey, 1998; Quiroga y Sellanes, 2009). Esto se ve reflejado en las estimaciones de las edades máximas para distintas especies de ofiuroides (Tabla 5.4), variando la mayoría entre los 10 y 25 años, con la notable excepción de la longeva especie antártica *Astrotoma agassizii* para la cual se ha estimado una edad máxima igual a 91 años (Dahm, 1996). En base a la información disponible, es posible dividir los patrones de crecimiento de los ofiuroides en tres grupos: aquellas especies de crecimiento lento y constante tanto en juveniles como adultos, como lo observado para *Ophioplocus esmarki*, *Ophionereis annulata*, *Ophionotus hexactis*, *Ophiura Ijungmani*, *Ophiura (Ophiuroglypha) lymani* y *Ophioplocus incipiens*; un segundo patrón como el de *Ophioplocus januarii*, *Ophiura albida*, *Ophionotus victoriae*, *Ophiocten gracilis*, *Ophiomusium lymani*,

Amphiura chiajei, *Ophiocten hastatum* y *Amphiura filiformis* quienes presentan rápido crecimiento inicial, seguido de una disminución en el crecimiento; y por último se encuentran especies como *Astrotoma agassizii*, *Stegophiura* sp., *Astrobrachion constrictum*, *Ophioplinthus brevirima* y *Ophioplinthus gelida* quienes presentan un lento crecimiento y una alta longevidad. Los dos primeros patrones tienden a prevalecer en especies de aguas poco profundas, mientras que el último sería característico de especies que habitan a mayores profundidades.

6- REPRODUCCIÓN

6. Reproducción.

6.1 Introducción

La regulación del ciclo reproductivo no sólo es la sincronización de la liberación de las gametas sino que abarca varios aspectos de la fisiología y comportamiento del organismo. La duración de un ciclo de reproducción puede ser interpretado como una función de la tasa de crecimiento, el desarrollo y la posterior maduración de los tejidos gonadales, terminando en eventos de liberación de las gametas, seguidos de un periodo de recuperación (Hendler, 1991). La temporada de reproducción de una especie, usualmente delineada en término de meses, es generalmente definida como el periodo del año en el cual la mayoría de los individuos de una población presenta abundante cantidad de gametas maduras disponibles para ser liberadas (Giese y Pearse, 1974). En algunas especies se desarrolla sólo un ciclo gametogénico en cada individuo durante la estación reproductiva. Las gametas pueden ser liberadas simultáneamente o intermitentemente durante cada temporada de reproducción (Giese y Pearse, 1974).

En equinodermos y otros invertebrados marinos, los ciclos reproductivos presentan usualmente periodicidad anual, estacional o mensual, comprendiendo a la mayoría de los individuos de una determinada población (Fenaux, 1970). El patrón reproductivo cíclico se encuentra generalmente asociado a hábitats donde los factores ambientales (fotoperiodo, temperatura, etc.) fluctúan de acuerdo a un régimen predecible. Sin embargo, un patrón reproductivo “continuo” ha sido propuesto para muchas otras especies, principalmente las que se encuentran distribuidas cercanas a la línea del ecuador o en hábitats de aguas profundas (Borges *et al.*, 2009). Varios autores

(e.g., Mercier y Hamel, 2009) recomiendan emplear el término “aperiódico”, en referencia a la ausencia de algún patrón detectable, debido a que muchas veces no es claro si estas especies desarrollan las gametas y las liberan de manera oportunista (o continua) o que parte de la población sigue un patrón cíclico (por ejemplo, mensual) que no es detectable mediante las técnicas de muestreo y análisis convencionales.

Con la excepción de un reducido número de mamíferos, incluyendo a los humanos, la mayoría de los animales presentan ciclos reproductivos definidos o cierta estacionalidad reproductiva (Mercier y Hamel, 2009). Tanto la coordinación como la duración de los periodos reproductivos son elementos cruciales en la estrategia global de la historia de vida de un organismo (Giese *et al.*, 1991). La actividad reproductiva se encuentra usualmente sincronizada para coincidir con condiciones ambientales óptimas para el desarrollo y supervivencia de las crías, incluyendo la disponibilidad de alimento. El éxito reproductivo en los equinodermos, al igual que en otros invertebrados marinos, depende de procesos altamente sincronizados entre los individuos de una población al nivel del desarrollo y la liberación de las gametas. En general se cree que dicha sincronización se encuentra mediada por señales externas (factores ambientales) que pueden actuar de manera directa o indirecta, solos o en asociación, para ajustar o mantener el ritmo biológico. Distintas especies pueden presentar diferentes y definidas estrategias y periodicidad reproductiva, basadas en gran parte en su historia de vida específica, estructura social, tipo de gónadas y desarrollo gametogénico, sistema endocrino, y respuesta a fluctuaciones o estímulos ambientales. Aún más, distintas poblaciones de una misma especie a menudo se reproducen en diferentes tiempos, aún cuando

están modulados por la misma combinación de señales de sincronización (Hendler, 1991; Mercier y Hamel, 2009).

La mayoría de los ofiuroides son gonocóricos, presentando una serie de gónadas pares en cada área interradsial del disco central. Varias especies presentan algún grado de hermafroditismo, en cuyo caso las gónadas pueden estar diferenciadas en un grupo de ovarios y testículos o bien ocurrir como *ovotestes* (Smith, 1940; Hyman, 1955). Las bursas, estructuras exclusivas de los ofiuroides, cumplen entre otras funciones como salida común de múltiples gonoductos y como cámaras de cría en aquellas especies incubadoras, y por lo general se encuentran fusionadas en un continuo en aquellas especies que liberan sus gametas al medio (Hendler, 1991; Byrne *et al.*, 2008). La mayor parte de los ofiuroides tienen dos bursas en la base de cada brazo. La disposición de las gónadas es variable, pero en la mayoría de las especies se encuentran asociadas con el epitelio celómico de las bursas, donde pueden alojarse una o varias gónadas (Hyman, 1955; Patent, 1969; Hendler, 1991).

Gametogénesis.

La formación de las gametas ocurre de manera similar en la mayor parte de los animales, mediante el proceso denominado gametogénesis. Un ciclo gametogénico usualmente incluye la acumulación de nutrientes a ser empleados durante la gametogénesis, la proliferación de las células germinales y su diferenciación en gametas, y luego de la emisión de gametas, un periodo inactivo cuando las gametas residuales son reabsorbidas y el epitelio germinal eventualmente se reorganiza. Por lo general se observa poca actividad en las

gónadas luego de la liberación de las gametas, periodo a menudo llamado fase de reposo (Giese y Kanatani, 1987).

Diversos autores han propuesto dos hipótesis principales para explicar el control del ciclo gametogénico entre los individuos: (1) puede ser intrínseco, estando su coordinación regulada por factores endógenos (internos) (e.g., por acumulación de nutrientes y la interacción de hormonas entre los centros de control y las gónadas); (2) puede ser extrínseco, o bajo control exógeno (externo) (e.g., mediados vía cambios ambientales) (ver Mercier y Hamel, 2009). Se ha postulado que siempre que los ciclos gametogénicos individuales se encuentren sincronizados en una población, existe algún tipo de regulación exógena (Giese y Pearse, 1974; Giese *et al.*, 1991).

La coordinación de la reproducción de una población puede ocurrir rítmicamente o esporádicamente durante parte o todo el año, o puede ocurrir sin obvia periodicidad. Cuando es rítmica, el periodo reproductivo puede ser diario, semi-mensual, mensual, semi-anual, anual o bianual (Giese y Pearse, 1974). La producción de gametas de manera continua a lo largo de todo el año en un individuo es poco frecuente, dado que por lo general existe alguna pausa entre ciclos gametogénicos sucesivos. La gametogénesis puede estar escalonada entre diferentes individuos a lo largo del año, de esta manera la reproducción puede aparentar ocurrir continuamente a lo largo del año para toda la población (Giese y Pearse, 1974).

Además de la gametogénesis y el crecimiento gonadal, otros eventos secuenciales, como la alimentación, el almacenamiento y la redistribución de nutrientes, también son parte del ciclo reproductivo. Si la coordinación del ciclo reproductivo estuviera determinada sólo de manera endógena, es decir sólo

por el tiempo necesario para completar un ciclo reproductivo, se esperaría observar reproducción continua o reproducción que no se vea afectada por localidad geográfica (Giese y Pearse, 1974). Sin embargo, esto rara vez ocurre. Los factores ambientales varían con el tiempo y las estaciones, y es común encontrar procesos reproductivos periódicos, presumiblemente coordinados con el fin de aprovechar condiciones favorables, especialmente en términos de supervivencia larval.

Con respecto al tipo de desarrollo, algunos trabajos indican que una especie del mismo género que la aquí estudiada, *Ophioplocus japonicus*, se reproduce mediante larvas lecitotróficas que completan su desarrollo en menos de una semana (Komatsu y Shosaku, 1993), y que otra, *O. esmarki*, es vivípara e incuba a sus crías en las bursas (Medeiros-Bergen y Ebert, 1995). Sin embargo, en la actualidad es muy poco lo que se conoce del resto de las especies de la clase. Por ejemplo, el modo de desarrollo larval sólo se conoce para poco más del 4% de todas las especies (Hendler, 1991).

Correlación con factores exógenos.

En la clase Ophiuroidea la actividad reproductiva puede ser continua a lo largo de todo el año, o existir una cierta estacionalidad reproductiva. En muchas especies con un ciclo de gametogénesis anual, el periodo reproductivo se extiende durante varios meses. La influencia de factores ambientales sobre la gametogénesis en ofiuroideos aún no se termina de comprender. La temperatura y el fotoperiodo son factores que podrían regular directamente la periodicidad reproductiva en los ofiuroideos (Hendler, 1991; Mercier y Hamel, 2009). Otros factores propuestos son la variación estacional de nutrientes,

tanto para los adultos como para las larvas, y la disponibilidad de hábitat (Giese y Pearse, 1974; Giese *et al.*, 1991).

A menudo se ha planteado que la reproducción se encuentra coordinada con factores ambientales con el objetivo de maximizar el éxito de fertilización y/o supervivencia de la descendencia. Para que esto ocurra, los individuos deben iniciar la gametogénesis antes que las condiciones sean las óptimas, y tienen que ser capaces de detectar los cambios ambientales que dan lugar a la sincronización de la reproducción con la subsiguiente condición favorable. Estos cambios ambientales pueden ejercer control exógeno sobre la reproducción, y no necesariamente estar restringidos a un solo factor, sino que pueden consistir en varios factores que interactúan para sincronizar las actividades reproductivas, aún cuando un factor sea dominante, al menos bajo ciertas circunstancias (Giese y Pearse, 1974).

La búsqueda de los factores ambientales que ejercen control sobre los periodos reproductivos de los invertebrados marinos ha sido tema de estudio en muchos trabajos (ver Hendler, 1991). A pesar de estos estudios, es muy poco lo que se conoce sobre cuales son los posibles factores ambientales que controlan la reproducción, y su identificación muchas veces ha sido especulativa debido en parte a la poca comprensión de cómo múltiples, y a menudo superpuestos, ciclos ambientales pueden producir patrones temporales definidos (Mercier y Hamel, 2009).

El fotoperiodo y la temperatura han sido identificados como los factores reguladores más probables de la reproducción en equinodermos. Más allá de la relación intrínseca entre estos dos factores, se distingue en muchos trabajos la evidencia de control vía fotoperiodo/horas luz y vía la temperatura. A partir de

los datos de las variaciones estacionales en estos factores, se procede a realizar correlaciones con los cambios en los estadios reproductivos de los ejemplares estudiados. Si bien estas correlaciones pueden resultar sugestivamente positivas o negativas, las causas subyacentes de la relación son a menudo poco claras (Chia y Walker, 1991).

La temperatura ha sido considerada por mucho tiempo como el factor más importante en la determinación de los ciclos reproductivos de invertebrados marinos. En los últimos años se ha probado que esta afirmación es adecuada para las áreas polares y templadas, donde se puede observar claros patrones estacionales de reproducción, mientras que existen varios ejemplos de ciclos reproductivos aperiódicos en lugares cercanos al ecuador (Pearse *et al.*, 2009). Varios estudios sobre ciclos reproductivos en ofiuroideos han reportado que las temporadas reproductivas podrían estar influenciadas por la temperatura ambiente del agua (Hendler, 1991; McClintock *et al.*, 1993), pero la evidencia de esto continúa siendo algo ambigua (Mercier y Hamel, 2009).

La coordinación de los procesos reproductivos en invertebrados marinos se encuentra controlada por los sistemas nervioso y endocrino, y/o neuro-endocrino. Otros factores como las fluctuaciones estacionales de variables ambientales y señales químicas podrían actuar como causas proximales para sincronizar la reproducción mediante la inducción de cambios bioquímicos en las gónadas (Mercier y Hamel, 2009). El ciclo gametogénico anual de ciertos equinodermos es el resultado de intrincados mecanismos que involucran hormonas específicas y sus tejidos objetivo. Aún no se conoce cómo es que las señales externas son percibidas por el cuerpo de los equinodermos y luego

transmitidas e interpretadas por efectores internos. En los ofiuroideos existe muy poca información sobre ritmicidad fisiológica interna relacionada con la reproducción. Se conoce que el AMP cíclico inicia la maduración oocitaria en *Amphipholis kochii* (Yamashita, 1986, 1988).

Objetivos específicos

El propósito del presente capítulo es estudiar la reproducción de *O. januarii* y discutir los posibles factores involucrados en su regulación. Con este fin, se evaluará la existencia de un ciclo estacional definido, se calculará y estudiarán las variaciones en el tiempo del índice gonadal; se validarán los resultados mediante el análisis histológico de las gónadas, y se comparará su evolución temporal con la correspondiente a las variables ambientales. Además se estimará el tipo de desarrollo larval en función de las máximas tallas oocitarias registradas en relación a las posibles alternativas de desarrollo que esto habilita.

6.2 Metodología

Los ejemplares utilizados en los estudios reproductivos fueron los capturados según lo indicado en la sección "Metodología general".

Para cada individuo estudiado se registró el diámetro mayor del disco, el largo del brazo mayor y el peso húmedo del animal completo. Entre 10 y 20 individuos de cada mes fueron disecados bajo lupa estereoscópica, siendo separados el estómago y las gónadas. Estas últimas fueron pesadas con el fin de calcular el índice gonadal. Las medidas fueron registradas empleando un

calibre vernier de precisión 0,1 mm y los pesos mediante balanza Mettler de precisión 0,1 mg.

Una porción de las gónadas (o su totalidad según la cantidad de gónadas presentes) fue deshidratada en una secuencia creciente de alcohol, según los siguientes pasos:

- 1) Etanol 70°.
- 2) Etanol 80° durante una noche.
- 3) Etanol 96° 2 horas.

Luego las muestras fueron incluidas en resina plástica Historesin Leica y se dejaron secando en este medio por no menos de una semana. A continuación se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor empleando un micrótopo motorizado digital Leica y las secciones fueron montadas en portaobjetos. Posteriormente se realizó la tinción con hematoxilina y eosina, según el siguiente protocolo:

- 1) Hidratado con agua destilada (pasaje rápido).
- 2) Hematoxilina durante 20 minutos.
- 3) Lavado en agua corriente.
- 4) Eosina alcohólica durante 8 minutos.
- 5) Etanol 90° durante 30 segundos.
- 6) Etanol 100° durante 30 segundos (dos veces).
- 7) Secado y montado definitivo.

Los cortes histológicos fueron observados bajo microscopio óptico Zeiss Axio Imager Z1 y fotografiados con una cámara digital AxioCam HRc, anexa al microscopio. Con el objetivo de realizar el análisis de frecuencias de tallas

oocitarias se realizaron dos mediciones perpendiculares de cada oocito que presentara núcleo y nucleolo visibles, tomando el promedio de estas dos mediciones como el diámetro oocitario. Las mediciones se realizaron a partir de las imágenes capturadas usando el paquete de software Axiovision v.4.4.

Adicionalmente se estudiaron individuos de tallas menores, con un diámetro de disco menor a 10 mm, a fin de obtener información acerca de las etapas iniciales del desarrollo gonadal.

Con el fin de describir la morfología de los espermatozoides, se procesaron gónadas de un macho, mediante deshidratación por punto crítico. Los testículos fueron cortados a la mitad empleando un bisturí y luego fueron montados en tacos metálicos para MEB y recubiertos con una lámina de oro-paladio. Finalmente fueron fotografiados los preparados en el microscopio electrónico de barrido.

El sexo de los individuos se determinó mediante la observación de preparados de una porción de las gónadas al microscopio y confirmado por los preparados histológicos. El desvío de la proporción 1:1 de los sexos para cada mes y para todos los individuos estudiados se realizó mediante una prueba de Chi-cuadrado (Zar, 1999). Las variaciones del índice gonadal entre los distintos meses fueron analizadas mediante ANOVA de una vía. Las diferencias entre el índice gonadal, peso y diámetro del disco, para machos y hembras fueron analizadas mediante pruebas-t de Student para muestras independientes. El supuesto de normalidad de los datos fue evaluado mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors) y la homogeneidad de las varianzas mediante una prueba de Levene. La relación entre las variables ambientales fotoperiodo y temperatura del agua con el índice gonadal, así

como la relación entre los índices de cada sexo por separado, fueron evaluadas mediante una correlación de Pearson (Sokal y Rohlf, 1995).

6.3 Resultados

Ophioplocus januarii es una especie gonocórica sin aparente dimorfismo sexual y no es posible sexar los individuos a partir de la coloración de las gónadas. La gónada está conformada por múltiples lóbulos tanto en machos como en hembras. La proporción de sexos de la población de *Ophioplocus januarii* estudiada no difiere significativamente de la relación 1:1 (Chi-cuadrado=2,1333; $p>0,05$). Tampoco se observó desvío de esta proporción analizando cada mes por separado ($p>0,05$). Se observaron diferencias significativas entre el peso (t-Student=2,0506; $p<0,05$) y la talla de disco (t-Student=2,2226; $p<0,05$) según el sexo, siendo mayores en ambos casos los valores registrados para los machos. En total se estudiaron histológicamente 134 hembras y 169 machos.

6.3.1 Índices gonadales

Se pueden observar variaciones en los valores del índice gonadal a lo largo de los meses de estudio (Fig. 6.1), existiendo diferencias significativas entre los valores a lo largo de los meses estudiados (ANOVA, $F=13,109$; $p<0,001$). Si bien este análisis fue el único para el cual no se pudo comprobar homogeneidad de las varianzas, el ANOVA es robusto al incumplimiento de este supuesto con tamaños de muestras grandes e iguales en todos los grupos (en este caso, $n=30$ para cada mes).

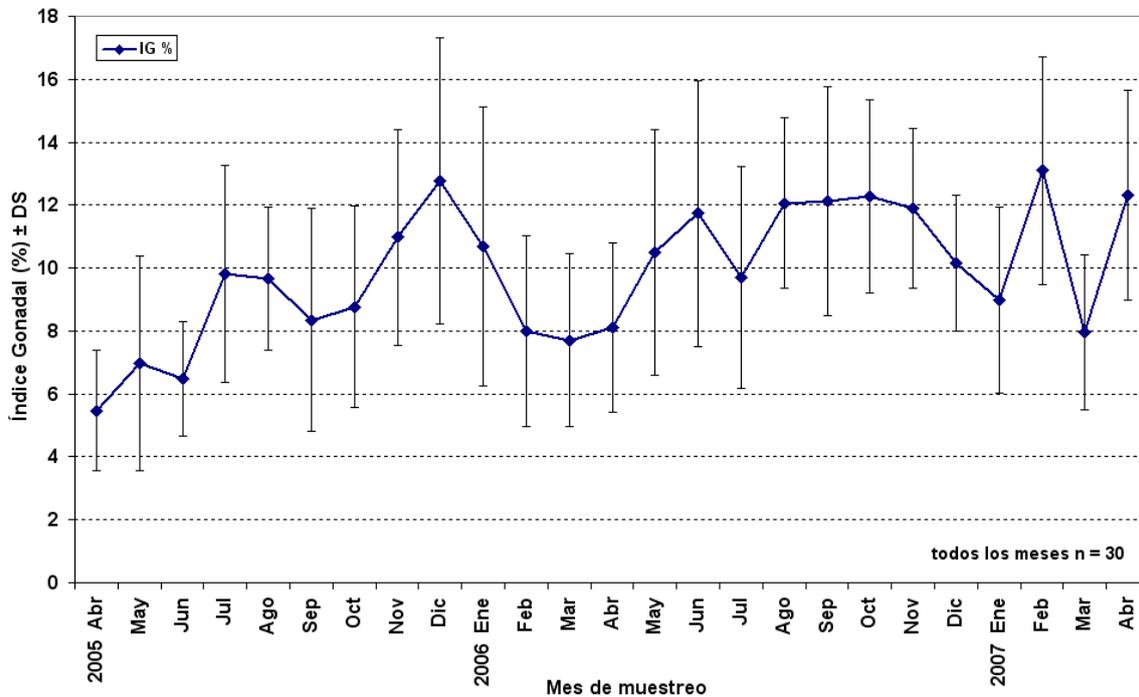


Figura 6.1. Variación de los valores del índice gonadal promedio mensual (machos y hembras conjuntamente) para todo el periodo estudiado. Las barras verticales representan el desvío estándar de los valores correspondientes para cada mes.

Luego de la identificación de los sexos es posible estudiar las variaciones en los índices gonadales discriminados por sexos (Fig. 6.2). El índice gonadal de los machos y de las hembras se encuentran correlacionados positivamente (Pearson, $r=0,8246$; $p<0,001$). Si bien se observaron diferencias significativas en los valores del índice gonadal de los machos ($n=395$) y el de las hembras ($n=355$) (t -Student= $3,6972$; $p<0,01$), siendo el de los machos, en general mayor al de las hembras, la evolución temporal de los valores medios del índice gonadal para machos y hembras describió patrones similares, salvo mínimas excepciones.

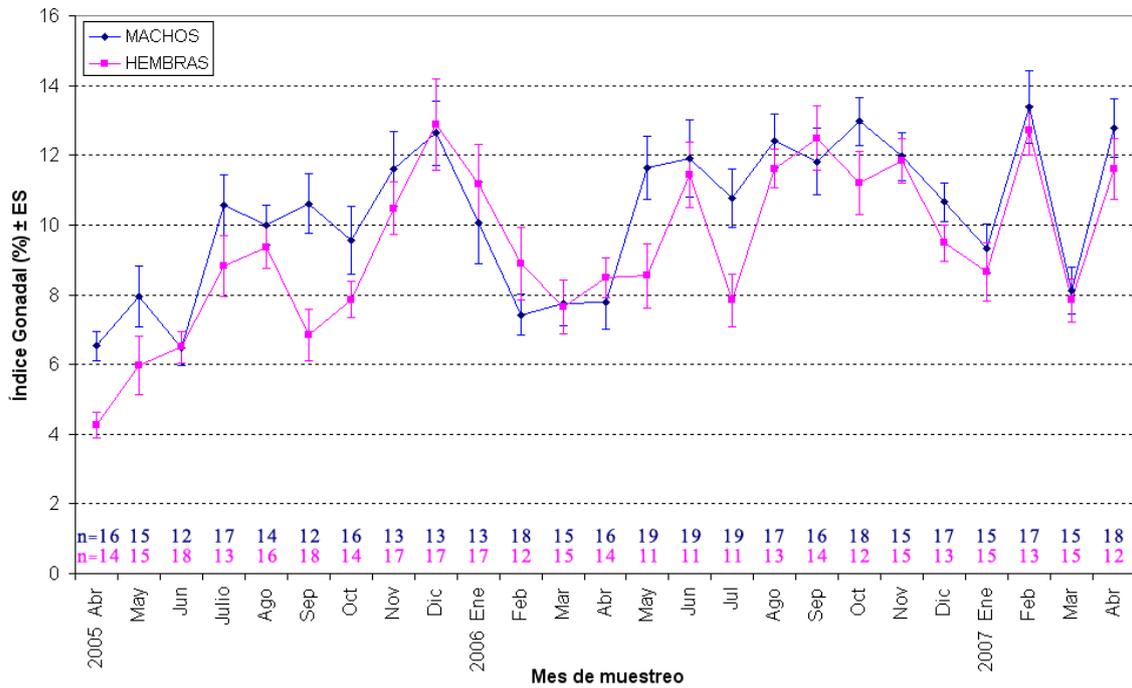


Figura 6.2. Valores del índice gonadal promedio mensual diferenciados para machos (en azul) y hembras (en rosa). Las barras verticales representan el error estándar de los valores correspondientes a cada mes.

6.3.2 Análisis histológico y microscopía electrónica de barrido

La pared de las gónadas de *O. januarii* presenta dos capas de tejidos, un saco externo y un saco interno sobre el que descansa el epitelio germinal, estando separados ambos sacos por el celoma genital (Fig. 6.3 D y Fig. 6.5 A). El saco externo corresponde al peritoneo visceral; en la pared del saco interno, también de naturaleza peritoneal se observa presencia de células musculares (Fig. 6.3 A y Fig. 6.6 A).

Hembras

Los ejemplares estudiados presentaron un diámetro de disco entre 10,2 y 20,4 mm (promedio ± DS: 15,7 ± 1,8 mm). Las hembras presentaron, a través

de todo el periodo estudiado, ovarios con oocitos en distintos estadios de desarrollo simultáneamente (Fig. 6.3 B y Fig. 6.4 C). A lo largo del año, los tipos oocitarios más abundantes siempre fueron los oocitos previtelogénicos (<100 μm), junto a estadios intermedios de vitelogénesis (entre 100 y 250 μm) y algunos oocitos en etapas finales de la vitelogénesis (>250 μm). Desde los estadios intermedios de desarrollo se comienzan a apreciar gránulos de vitelo y gotas lipídicas, más abundantes en los oocitos en etapas avanzadas y finales de la vitelogénesis.

Desde etapas tempranas del desarrollo, cada oocito se encuentra circundado por un epitelio cuya histología es similar al epitelio del saco interno (Fig. 6.3 C).

Página siguiente: **Figura 6.3.** Imágenes de los cortes histológicos de hembras. **A-** Ovario con oocitos en distintos estadios de desarrollo; se observa el saco externo (se) y el saco interno (si), este último presenta células musculares (m). **B-** Ovarios con oocitos en distintos estadios de desarrollo simultáneamente; se observan oocitos en avanzado grado de vitelogénesis (lv), oocitos comenzando la vitelogénesis (mv) y oocitos pre-vitelogénicos (pv). **C-** Detalle del epitelio que rodea a los oocitos (indicado con flechas). **D-** Ovarios más chicos, donde también se observan oocitos en distintos grados de desarrollo; se señalan el saco externo (se) y el saco interno (si). Barras de escala: A, B =500 μm ; C, D =200 μm .

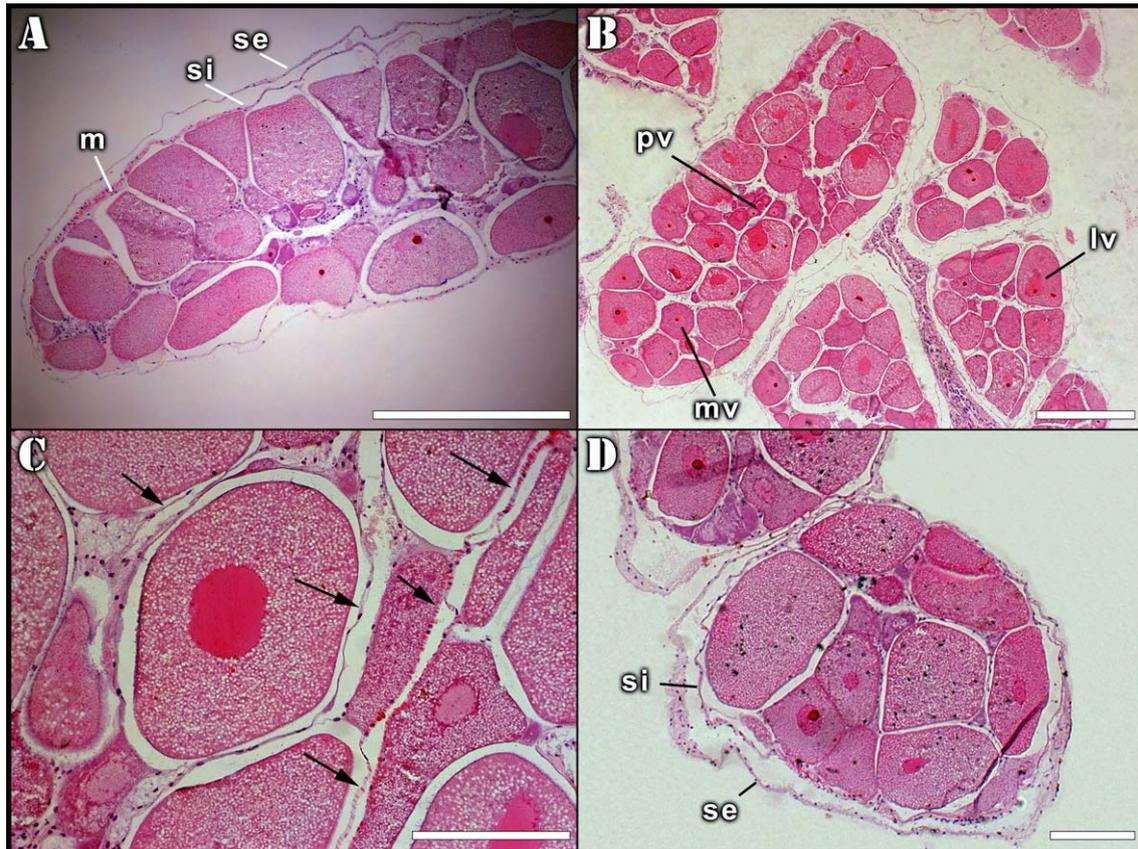


Figura 6.3.

Sólo en ovarios de dos hembras se observaron imágenes histológicas compatibles con estadios de evacuación o recuperación. Los ovarios contenían pocos oocitos completamente vitelados junto a varios oocitos previtelogénicos. Generalmente estos oocitos son reabsorbidos o pueden seguir su desarrollo hasta la evacuación. En una hembra se registró la presencia de fagocitos y materiales residuales de procesos de reabsorción (Fig. 6.4 B) dentro de un ovario conteniendo también oocitos en distintos grados de desarrollo.

En algunos casos fue posible reconocer ovarios parcialmente evacuados (Fig. 6.4 A), evidenciados por oocitos menos densamente empaquetados en los ovarios, con espacios libres entre ellos y con la pared del ovario parcialmente colapsada.

No fue posible, a nivel individual, describir estadios de madurez gonadal definidos mediante el análisis histológico. Las hembras presentan oocitos en desarrollo en todos los meses de estudio, sin acumulación importante de oocitos completamente vitelados, presentando distintas tallas oocitarias simultáneamente, incluso en los ovarios más chicos (Fig. 6.3 D). Así, el tamaño de los ovarios se encuentra en correspondencia con la cantidad de gametas presentes y no necesariamente con el grado de desarrollo de los tipos oocitarios presentes.

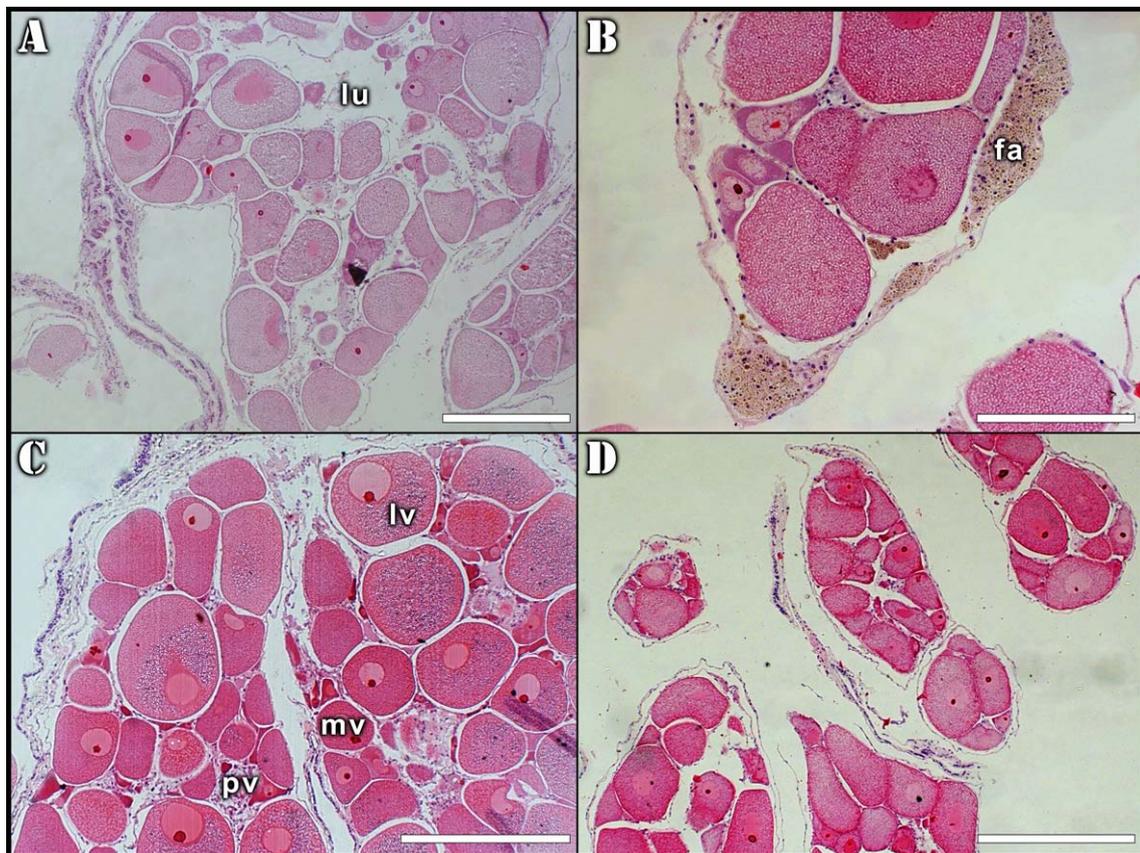


Figura 6.4. Imágenes de los cortes histológicos de ovarios. **A-** Ovario con oocitos en distintos estadios de desarrollo; se observa un espacio libre en el lumen (lu) evidenciando liberación de gametas. **B-** Ovario donde se observó la presencia de fagocitos (fa), evidenciando reabsorción de algunas gametas. **C-** Ovarios con oocitos en distintos estadios de desarrollo simultáneamente; se observan oocitos en avanzado grado de vitelogénesis (lv), oocitos comenzando la vitelogénesis (mv) y oocitos pre-vitelogénicos (pv). **D-** Ovarios de un individuo de 9,9 mm de diámetro de disco, donde también se observan oocitos en distintos grados de desarrollo. Barras de escala: A, C, D =500 μ m; B =200 μ m.

Machos

Los ejemplares estudiados presentaron un diámetro de disco entre 10,1 y 20,7 mm (promedio \pm DS: 16,0 \pm 1,8 mm). Al igual que lo que ocurre en los ovarios, los testículos presentan simultáneamente espermatozoides maduros, libres en el lumen, junto a columnas de espermatocitos en distintos grados de desarrollo (Fig. 6.5 A y Fig. 6.6 D). El epitelio germinal descansa sobre el saco interno, y la espermatogénesis se desarrolla formando columnas hacia el lumen de los testículos. En estas columnas se pueden reconocer espermatogonias, espermatocitos y espermátidas, y finalmente los espermatozoides ya maduros son liberados y acumulados en el lumen del testículo.

En los testículos donde se evidenció evacuación parcial de gametas se observan espermatozoides maduros en el centro, rodeados de espacios libres en el lumen (Fig. 6.5 C y D). Al mismo tiempo también se observan columnas de espermatocitos en desarrollo. Otros machos presentaron los testículos repletos de espermatozoides maduros, llenando todo el lumen de las gónadas, y con reducción de las columnas de espermatocitos (Fig. 6.5 B).

Página siguiente: **Figura 6.5.** Imágenes de los cortes histológicos de testículos. **A-** Detalle de un testículo en desarrollo, presentando espermatozoides desarrollados (sz) en el lumen, columnas de espermatocitos (sc) y espermatogonias (sg); se observa el saco externo (se) y el saco interno (si) de la gónada. **B-** Testículos repletos de espermatozoides desarrollados (sz), las columnas de espermatocitos se encuentran reducidas. **C-** Testículos de un mismo individuo, donde se observa algunos de ellos repletos de espermatozoides desarrollados (sz) mientras que simultáneamente en otros se evidencia liberación de gametas mediante lumen (lu) libre. **D-** Espacios libres en el lumen (lu) del testículo luego de la liberación de gametas. Barras de escala: B, C =500 μ m; A, D =200 μ m.

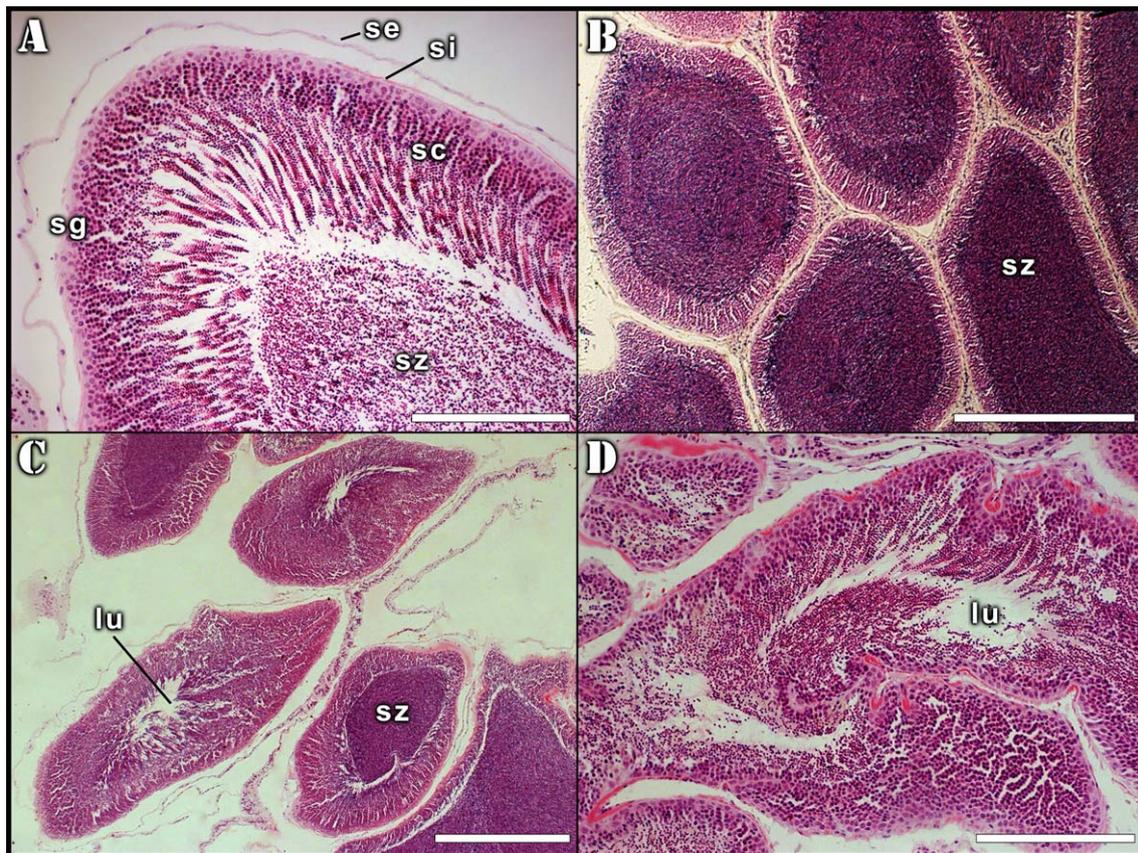


Figura 6.5.

Los procesos de reabsorción fueron más evidentes en los machos que en las hembras, evidenciados por la presencia de fagocitos y materiales remanentes de la reabsorción en el lumen de los testículos, en algunos casos, ocupando el centro y rodeados por elementos maduros correspondientes a una nueva onda de maduración (Fig. 6.6 A, B y C). En algunos casos y para un mismo macho estos fagocitos se encontraron presentes en algunos testículos mientras que en los demás se observaron estadios similares a la evacuación. Esto también se observó para otros machos que presentaban testículos evacuados y testículos repletos de espermatozoides al mismo tiempo (Fig. 6.5

C). También se observó presencia de fagocitos en testículos no evacuados y repletos de espermatozoides maduros (Fig. 6.6 B).

En los machos se puede observar espermatozoides maduros en todos los meses analizados, incluso en ejemplares muy chicos (Fig. 6.6 D).

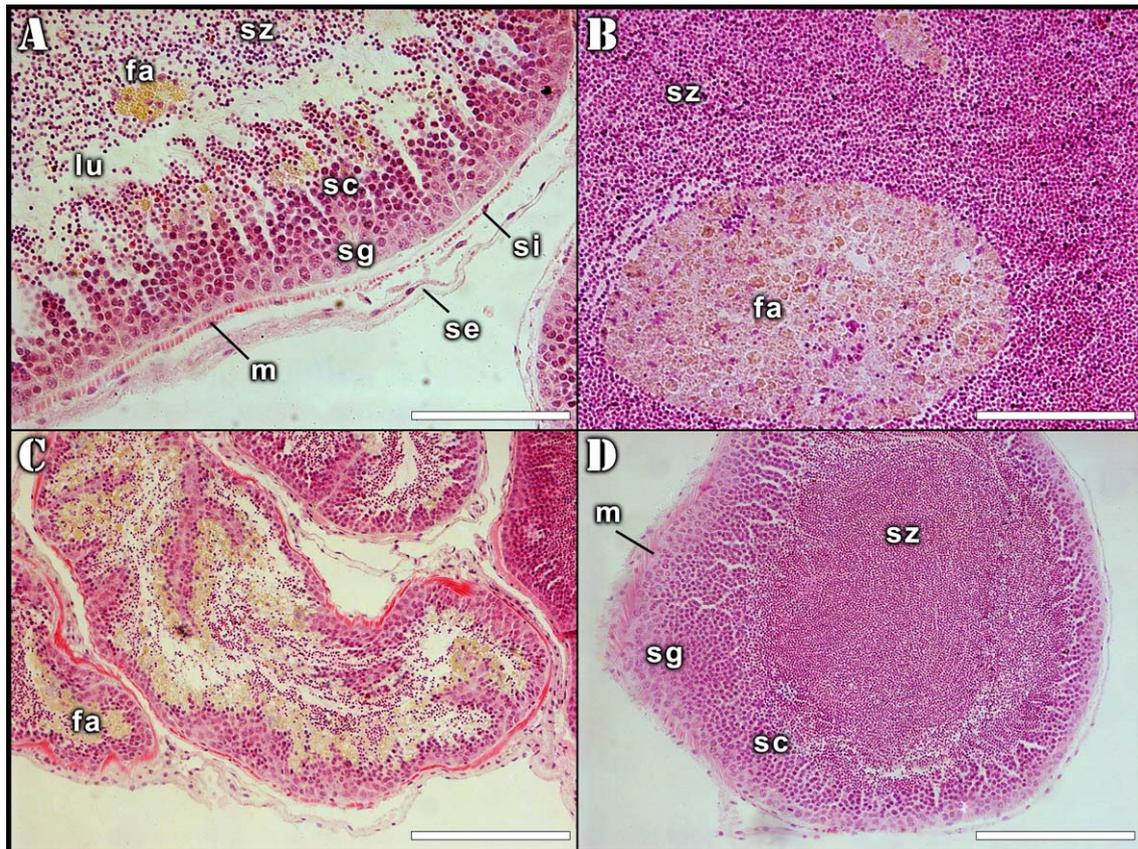


Figura 6.6. **A-** Detalle de un testículo en proceso de reabsorción, presentando fagocitos (fa) en el lumen (lu) que rodean a los espermatozoides remanentes (sz) y sobre las columnas espermáticas; se observan las espermatogonias (sg), los espermatocitos (sc), el saco externo (se) y el saco interno (si) de la gónada, este último presentando células musculares (m). **B-** Detalle de un testículo con espermatozoides (sz) no liberados en proceso de reabsorción por parte de los fagocitos (fa). **C-** Testículos en proceso de reabsorción de gametas, evidenciado por la presencia de fagocitos (fa). **D-** Testículo de un individuo de 7,6 mm de diámetro de disco, presentando espermatozoides desarrollados (sz), espermatocitos (sc) y espermatogonias (sg); se observan las células musculares (m) del saco interno de la gónada. Barras de escala: A, B =100 μ m; C, D =200 μ m.

No se evidenciaron en los cortes histológicos gonoductos en los ovarios ni en los testículos. Tampoco ocurrieron ejemplares hermafroditas.

Los espermatozoides de *O. januarii* consisten en una cabeza esférica, una pieza media corta diferenciada y una cola prominente (Fig. 6.7). El diámetro de las cabezas es constante, igual a 3 μm .

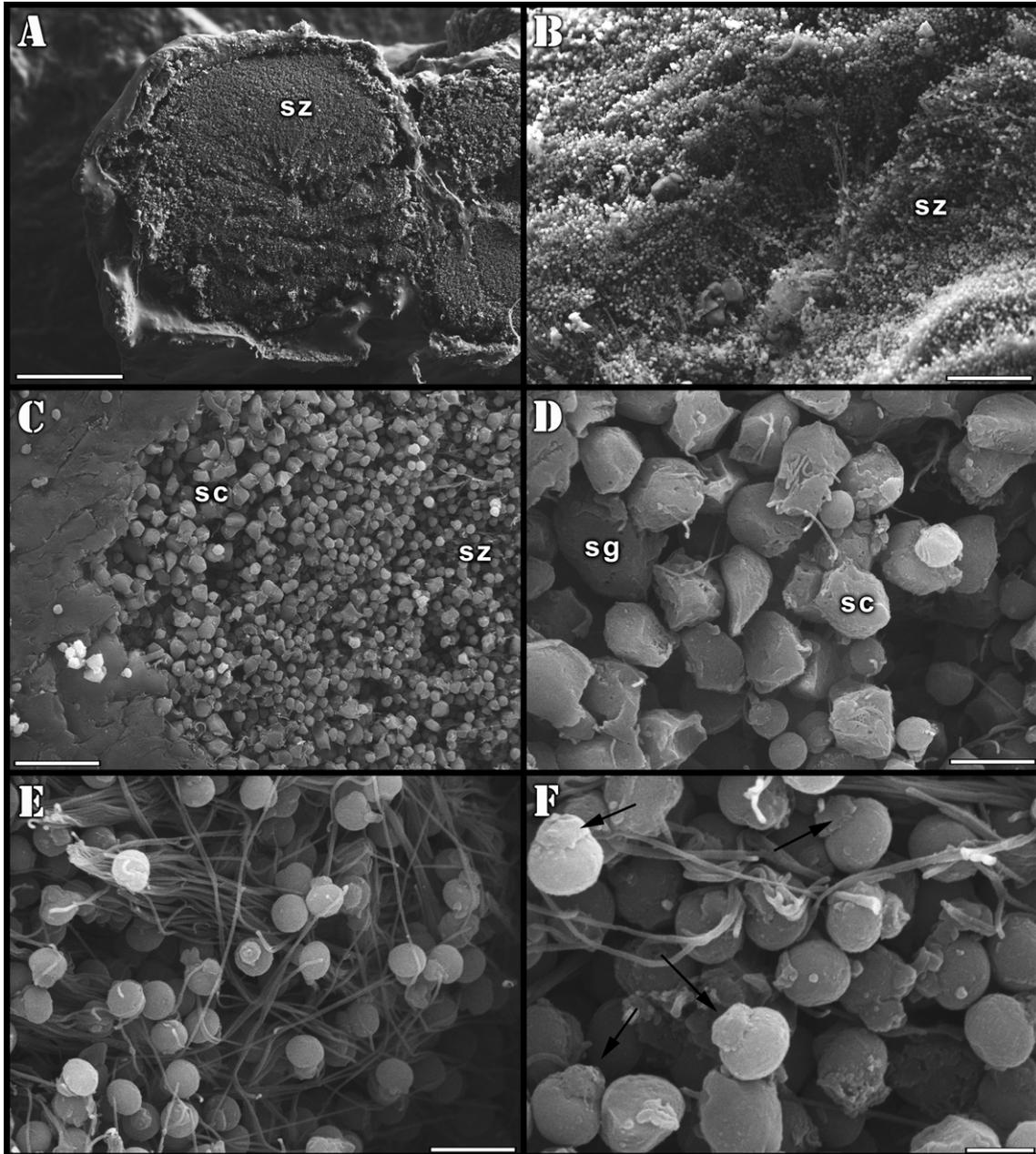


Figura 6.7. Imágenes al MEB de una sección de gónada de macho. **A-** Vista general de la sección de un túbulo conteniendo espermatozoides (sz). **B-** Vista ampliada de la sección media de A. **C-** Detalle de la porción externa del corte de la gónada; se observan espermatocitos (sc) y espermatozoides (sz). **D-** Detalle donde se observan espermatocitos (sc) y espermatogonia libre (sg). **E-** Detalle de los espermatozoides; se observan las cabezas esféricas y las largas colas. **F-** Detalle de las cabezas de los espermatozoides; se observa claramente la pieza media posterior (señalada con flechas). Barras de escala: A =200 μm ; B =50 μm ; C =20 μm ; D, E =5 μm ; F =2 μm .

6.3.3 Frecuencias de tallas oocitarias

Entre 30 y 200 oocitos fueron medidos para cada hembra (promedio \pm DS: $98,8 \pm 49,2$) siendo el número total de oocitos medidos igual a 13235.

En la Figura 6.8 se muestran las frecuencias porcentuales de las distintas clases de talla de oocitos para todos los meses de estudio. El análisis de las tallas oocitarias evidencia la poca variación en las clases de talla oocitaria dominantes a lo largo de los meses. En los meses cercanos al verano es posible reconocer una presencia más marcada de oocitos completamente vitelados, evidenciada por distribuciones bimodales. Sin embargo, en todos los meses la clase dominante la constituyen los oocitos en etapas iniciales del desarrollo.

Página siguiente: **Figura 6.8.** Histogramas mensuales de distribuciones de frecuencias porcentuales de tallas oocitarias para los 25 meses de estudio. N: número de hembras analizadas; n: número de oocitos medidos.

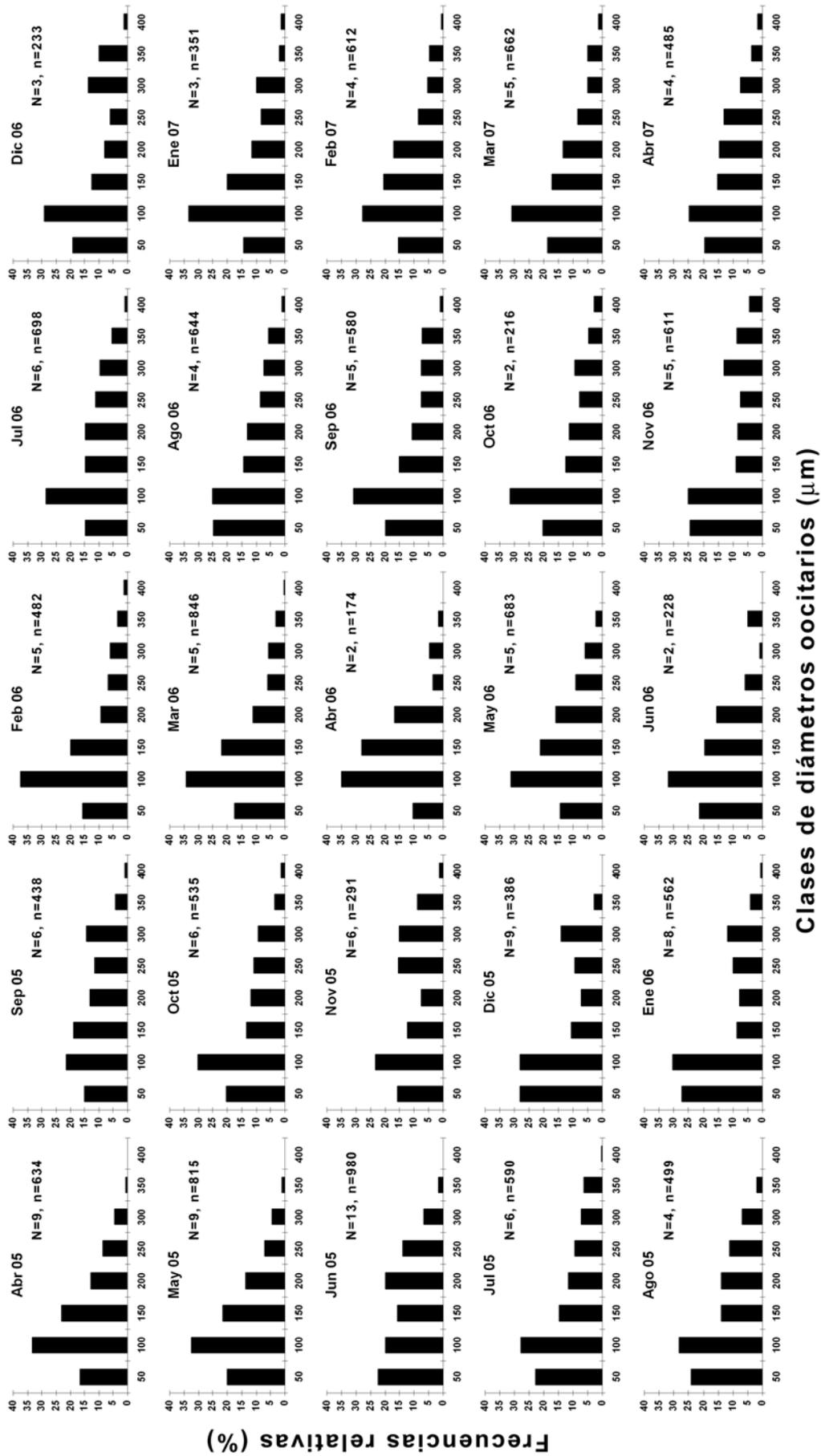


Figura 6.8.

No se observa acumulación de oocitos que hayan completado la vitelogénesis, lo cual estaría indicando la evacuación continua de los mismos. En los meses de verano, cuando se observa un pico modal de oocitos de la clase de talla de 300 μm , no hay incremento sensible de los porcentajes de frecuencia correspondientes a las clases mayores. Se definen pequeñas modas entre septiembre de 2005 y enero de 2006, centradas en las clases de tallas de 300 micrómetros de diámetro, con picos que no superan el 15%. Lo mismo se repite entre octubre de 2006 y enero de 2007. Las tallas oocitarias más grande registradas rondaron los 400 μm . Las tallas promedio de los oocitos (Fig. 6.9) se mantienen aproximadamente constantes en el tiempo. Lo mismo ocurre con las tallas promedio de los oocitos más grandes presentes en cada mes.

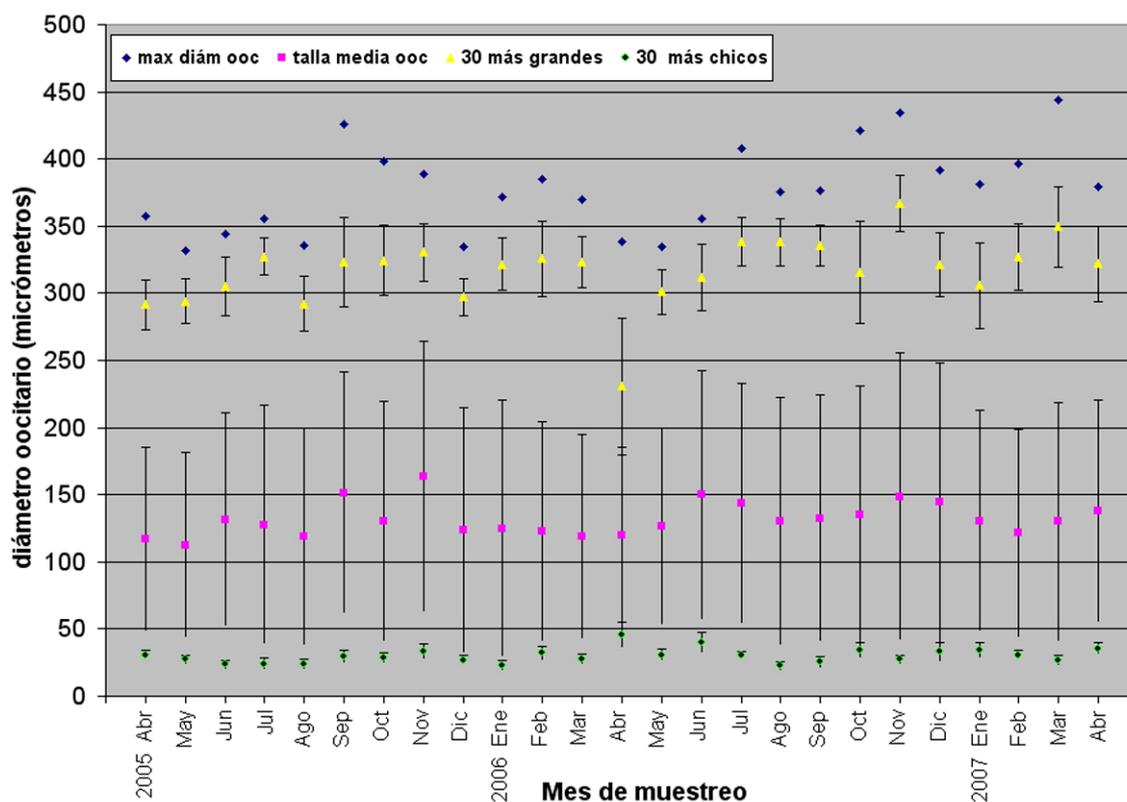


Figura 6.9. Tallas oocitarias promedio, máximas y mínimas medidas en todo el estudio. Las barras verticales representan el desvío estándar de cada mes.

Adicionalmente se realizó un análisis de tallas oocitarias para cada hembra (ver "Apéndice 2"). Se observó que las frecuencias relativas de las distintas clases oocitarias son similares entre las hembras, siguiendo el patrón descrito para las frecuencias acumuladas en cada mes.

De los individuos más pequeños analizados se identificaron machos con espermatozoides maduros, siendo el más pequeño registrado de 7,6 mm de diámetro de disco (Tabla 6.1). La hembra más chica registrada con oocitos vitelogénicos fue de 9,9 mm de diámetro de disco, sin embargo para otras dos (9,0 y 9,2 mm de diámetro) sólo se observaron pocos oocitos previtelogénicos. Para otros cuatro individuos entre 4,2 y 7,9 mm de diámetro de disco no fue posible reconocer microscópicamente gónadas evidentes.

Tabla 6.1: Resultados del análisis histológico de los individuos más pequeños.

Diámetro del disco (mm)	Presencia de gónadas	Sexo	Gametas desarrolladas
4,2	no	-	-
5,4	no	-	-
7,6	si	macho	si
7,7	si	macho	si
7,8	no	-	-
7,9	no	-	-
8,1	si	macho	si
9,0	si	hembra	no
9,2	si	hembra	no
9,9	si	hembra	si

6.3.4 Correlación con factores ambientales

No existe correlación entre el índice gonadal y las horas de luz (Pearson, $r=0,2845$; $p=0,168$), ni entre el índice gonadal y la temperatura del agua (Pearson, $r=-0,1959$; $p=0,348$), observándose únicamente correlación entre las horas de luz y la temperatura del agua (Pearson, $r=0,4959$; $p<0,05$). Sin embargo, las caídas parciales en los valores de índice gonadal durante la primavera podrían estar relacionadas con el aumento de temperatura desde la mínima (meses de agosto), mientras que la principal caída de los valores durante el verano correspondería a una disminución de las horas de luz desde los valores máximos (Fig. 6.10).

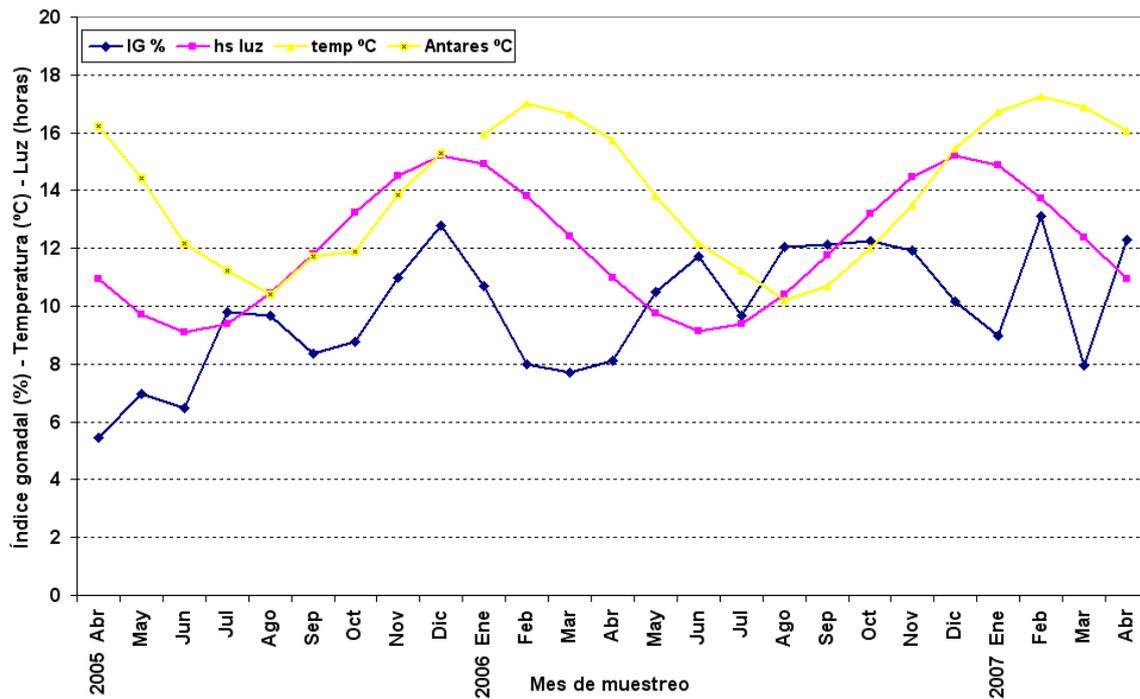


Figura 6.10. Valores del índice gonadal promedio mensual, variación de la temperatura del agua y variación de las horas de luz.

6.4 Discusión

Estudios recientes sobre reproducción en ofiuroideos indican que la duración y estacionalidad de las fases de gametogénesis son más variadas de lo que se creía previamente y que los periodos de liberación de gametas son usualmente mayores a tres meses (e.g., Hendler, 1991; Selvakumaraswamy y Byrne, 1995; Sumida *et al.*, 2000; Falkner y Byrne, 2003). Estudios anuales, e incluso más prolongados, sobre una determinada población han demostrado que las especies de aguas cálidas y las que habitan en las profundidades se reproducirían de manera continua. Algunos ofiuroideos tropicales presentan una breve estación de liberación de gametas, pero parecería existir una tendencia hacia periodos de liberación de gametas más largos en bajas latitudes (Hendler, 1991). El hecho de no observar para *O. januarii* en el análisis histológico los estadios típicos que definen un patrón cíclico de

reproducción sino la presencia de oocitos en desarrollo junto a oocitos que han completado la vitelogénesis, está indicando que se trata de un caso de reproducción aperiódica (sin un patrón cíclico definido). Dado que se observó prácticamente para todos los individuos analizados el mismo estadio reproductivo en simultáneo, se descarta la posibilidad de que se trate de un ciclo de reproducción asincrónico en la población como el observado en el pepino de mar *Isostichopus fuscus*, dónde un ciclo reproductivo desfasado a nivel poblacional era enmascarado por un índice gonadal aparentemente continuo (Mercier *et al.*, 2007). De esta manera, se puede concluir que *O. januarii* presenta un verdadero ciclo reproductivo del tipo continuo en aguas patagónicas. También se observa reproducción continua con ovarios conteniendo oocitos en diferentes estadios de desarrollo a lo largo de todo el año en *Ophiolepis paucispina* (Byrne, 1989), especie ovovivípara con oocitos de 400 µm de diámetro al final del desarrollo (Hendler, 1979). Tampoco en esta especie se observan gonoductos; los oocitos maduros son liberados mediante mecanismo desconocido dentro de las bursas dónde se lleva a cabo la fecundación (Byrne, 1989).

A pesar de que *O. januarii* presenta reproducción continua, se observan variaciones cíclicas en el índice gonadal. Las fluctuaciones del índice gonadal en el tiempo indican la existencia de meses con mayor intensidad de liberación de productos sexuales en los meses de verano, con otro pico de menor intensidad en agosto-septiembre. Esto mismo ha sido registrado para poblaciones de *Ophiophragmus filigraneus*, *Ophiothrix (Ophiothrix) angulata* y *Ophiothrix quinquemaculata* quienes liberan gametas con varios grados de intensidad a lo largo del año, pero muestran picos de liberación en la

primavera, comienzos del verano o en otoño (Guille, 1964; Stancyk, 1974, 1975). El hecho de no identificar un estadio de madurez total en el que el predominio sea el de los oocitos que han completado su vitelogénesis y la ausente o escasa proporción de animales con gónadas en reabsorción, indicaría que en *O. januarii* existe una liberación continua de gametas a lo largo del año, con moderados incrementos en primavera y verano, no existiendo un periodo de reposo gonadal definido. En la especie subtropical *Microphiopholis gracillima* los valores del índice gonadal son siempre altos y la población liberaría las gametas repetidas veces; en esta especie los ovarios contienen típicamente muchos oocitos en etapas iniciales de desarrollo y sólo algunos oocitos de gran talla, evidenciando que las hembras liberan frecuentemente un número limitado, bajo, de oocitos al medio (Singletary, 1980). Esto mismo se observa en los ovarios de *O. januarii*, dónde a partir del análisis histológico se puede descartar que las variaciones entre los meses en el índice gonadal se puedan deber exclusivamente a cambios en el estadio de madurez de las gametas, como las observadas en otras especies (Hendler, 1991). En cambio, estas variaciones corresponderían a variaciones en la cantidad de gametas (y por lo tanto en el tamaño de las gónadas) producidas en cada mes. Esto es especialmente cierto para el caso de las hembras, mientras que los machos también podrían estar mostrando variaciones en el peso de las gónadas debido a la evacuación y/o reabsorción de algunos de los testículos presentes en cada individuo. Para la población estudiada de *O. januarii* no es posible caracterizar el patrón temporal que sigue la reproducción sólo analizando el índice gonadal, sino que se requiere también realizar estudios histológicos y análisis de frecuencias de tallas oocitarias.

Se ha observado liberación continua de gametas para las especies de aguas profundas *Ophiophthalmus normani* y *Ophiomusium lymani*, y para las especies costeras de aguas cálidas *Microphiopholis gracillima*, *Ophiocoma pumila* y *Ophiothrix (Acanthophiothrix) suensonii* (Hendler, 1991). La especie tropical *O. pumila*, que también libera gametas a lo largo del año, mantiene un índice gonadal bajo debido a que los individuos de la población se reproducen de manera asincrónica. Asimismo, algunos individuos de otra especie tropical *O. (Acanthophiothrix) suensonii* presentan ovarios con oocitos que han completado la vitelogénesis mientras que otros se encuentran vacíos o con oocitos en crecimiento, evidencia que la reproducción continua es una manifestación de ciclos de asincronía individual (Mladenov, 1976, 1983). El análisis histológico, en conjunto al análisis de frecuencias de tallas oocitarias para cada hembra por separado, revelan que no existe asincronía, en términos generales, en el desarrollo de las gametas entre los individuos de *O. januarii*. Probablemente esta especie represente una transición entre modalidades reproductivas tropicales o subtropicales, continuas, a modos reproductivos típicos de aguas templadas, con estacionalidad marcada en la liberación de las gametas.

La influencia de factores ambientales en la gametogénesis de los ofiuroides no está completamente elucidada (Mercier y Hamel, 2009). Varios autores han propuesto que la gametogénesis y los periodos de reproducción se encuentran correlacionados con variaciones estacionales de distintos parámetros físicos y químicos, aún cuando muchas veces estas correlaciones resultaron ser débiles, probablemente indicativo del efecto conjunto de varios factores. La producción de gametas en *O. januarii* podría estar reflejando un

control exógeno por el fotoperiodo o a una combinación de las horas de luz y la temperatura. Para el hemisferio sur, el único registro de desarrollo gonadal relacionado a la temperatura del agua en ofiuroides es el de *Astrobrachion constrictum* en Nueva Zelanda, quien se reproduce estacionalmente durante abril-mayo (Stewart y Mladenov, 1995).

Debido a que se encuentran oocitos en diferentes estadios de desarrollo al mismo tiempo en los ovarios de *O. januarii*, no se distingue una capa germinal definida. Esto mismo observa Byrne (1989) para *Ophiolepis paucispina*, quien reconoce algunas células germinales en la base de los ovarios pero también las observa en otras partes del mismo. El origen de las células germinales está poco estudiado y su identificación requiere estudios de microscopía electrónica de transmisión.

Las gónadas de *O. januarii* son similares a las de otros ofiuroides que también presentan estructura formada por dos sacos, separados por el celoma genital. Sobre el saco interno descansa el epitelio germinal. Las paredes de los sacos externo e interno presentan células epiteliales y células mioepiteliales, una característica del epitelio celómico de los equinodermos (Byrne, 1989). La relación precisa entre los oocitos y la pared gonadal es difícil de comprender debido a que los diferentes tipos oocitarios no están espacialmente segregados; por esto, ésta relación ha sido pobremente documentada (Hendler, 1991). La oogénesis en equinodermos tradicionalmente se refiere como que puede ocurrir de manera "folicular" o solitaria (Walker, 1982). En la oogénesis "folicular" los oocitos se encuentran inmersos en el fluido hemal y rodeados por células "foliculares", siendo los "folículos" una estructura que recubre al oocito a través de todo su desarrollo y se ha sugerido que provee

soporte estructural y nutritivo a los oocitos en desarrollo (Moloney y Byrne, 1994). En *O. januarii* los oocitos se encuentran rodeados por un epitelio similar y probablemente derivado del saco interno; no se ha observado en microscopía óptica fluido hemal rodeando los oocitos, por lo que la ovogénesis es del tipo solitario. Patent (1976) describe algunas células entre las paredes del ovario y los oocitos en desarrollo para *Gorgonocephalus eucnemis*, infiriendo que actuarían como “células nutritivas”, transfiriendo sustancias al oocito en crecimiento. Por su parte Byrne (1989) encontró que la ovogénesis es solitaria en *Ophiolepis paucispina* y que las células epiteliales (parte interna del saco interno de la gónada) que se encuentran rodeando a los oocitos sirven sólo como soporte estructural.

Los espermatozoides de *O. januarii* son similares a los de otros ofiuroideos (Yamashita e Iwata, 1983). Consisten de una cabeza esférica, una pieza media mitocondrial corta diferenciada y una cola prominente. Tienen la morfología “primitiva” característica de organismos con fecundación externa. Incluso las especies incubadoras o las hermafroditas que se esperaría presenten gametas modificadas producen espermatozoides de esta forma (Chia *et al.*, 1975; Hendler, 1991).

Se reconocen dos tipos de desarrollo en las larvas de los ofiuroideos: Tipo I, con larva ophiopluteus, y Tipo II, mediante larva vitelaria (Selvakumaraswamy y Byrne, 2006), pudiendo variar el desarrollo entre planctotrófico, desarrollo abreviado y desarrollo directo. Según el tamaño máximo de los oocitos se pueden estimar los tipos de desarrollo; el tamaño máximo oocitario correspondiente a desarrollo directo se encuentra entre 100 y 1000 μm , para del desarrollo abreviado entre 130 y 350 μm , y para el desarrollo

planctotrófico entre 70 y 170 μm (Hendler, 1991). En base a las máximas tallas oocitarias observadas (hasta 400 μm) en *O. januarii* se propone que esta especie presenta desarrollo lecitotrófico abreviado. El desarrollo embrionario se completaría gracias a la provisión de reservas nutritivas presentes en los oocitos. Las larvas lecitotróficas vitelarias están caracterizadas por tener anillos transversales de cilias, sin esqueleto larval de soporte, aunque la presencia de vestigios de esqueleto hace que se las considere como larvas ophioplutei modificadas. La larva ophiopluteus que se alimenta en la columna de agua es considerada la forma larval ancestral para Ophiuroidea (Strathman, 1978). Varias especies que presentan larvas con desarrollo lecitotrófico tienen vestigios de la larva pluteus durante su desarrollo (Selvakumaraswamy y Byrne, 2000, 2004). Las larvas vitelarias se desplazan por la columna de agua, siendo su dispersión por deriva. La posible ausencia de larva planctotrófica y una rápida metamorfosis prevendría la dispersión favoreciendo el desarrollo en el hábitat paterno. Komatsu y Shosaku (1993) observan que *Ophioplocus japonicus* se reproduce mediante oocitos de 300 μm de diámetro, que luego de ser fecundados desarrollan en larva vitelaria que completa su desarrollo en seis días, presentando los juveniles forma pentagonal de 400 μm en diámetro. También *Ophiolepis cincta cincta* (Ophiolepididae) presenta huevos de diámetro igual a 300 μm y un desarrollo indirecto mediante una vitelaria (o larva lecitotrófica modificada) (Schoener, 1972). En la misma familia, se conocen algunas especies con desarrollo directo, como *Ophiozonella falklandica*, *Ophioplocus esmarki* y *Ophioplocus incipiens* (Schoener, 1972; Medeiros-Bergen y Ebert, 1995) y posiblemente también *Ophiomusium lymani* que presenta huevos de 500 μm (Schoener, 1972, Hensley *et al.*, 1995).

7- DISCUSIÓN GENERAL

7. Discusión general.

La población estudiada de *Ophioplocus januarii* se reproduce de manera continua a lo largo del año, existiendo algunos meses (agosto y meses de verano) donde la liberación de gametas es mayor. Esto último evidenciado por el índice gonadal, el cual para esta especie no tiene relación con el estadio de desarrollo de las gametas sino que es un indicador del tamaño de las gónadas (y proporcionalmente de la cantidad de gametas).

Los machos de *O. januarii* comienzan a desarrollar gónadas más tempranamente que las hembras. Machos de menos de 8 mm de diámetro de disco ya presentan espermatozoides en el lumen, mientras que para las hembras se observan oocitos completamente vitelados recién cuando su talla es cercana a los 10 mm. Medeiros-Bergen y Ebert (1995) observan que el desarrollo gonadal de *Ophioplocus esmarki* comienza cuando los individuos tienen unos 9 mm de diámetro de disco, lo cual es similar a lo aquí reportado para *O. januarii*, pero dado el lento crecimiento en esa otra especie, comenzaría a reproducirse varios años después. Teniendo en cuenta los resultados de edades para *O. januarii* y las tallas más chicas donde se han observado gametas desarrolladas esta especie alcanzaría su talla de madurez reproductiva a los dos y medio o tres años de vida.

Según la revisión de Thomas (1975) el género *Ophioplocus* sería originario de aguas frías, pero este mismo autor reconoce que la especie más parecida a *O. januarii* es *Ophioplocus declinans* que habita en aguas tropicales de Las Filipinas. El origen tropical podría explicar que esta especie se reproduzca de modo continuo, probablemente bajo regulación endógena, y que de algún modo los factores ambientales (regulación exógena) están regulando

la producción de gametas siguiendo el patrón de reproducción de especies de aguas templadas, con una tendencia a presentar estacionalidad marcada en la liberación de las gametas.

Un factor que numerosos autores reconocen que influencia la reproducción en equinodermos es la disponibilidad de alimento (e.g., Gage y Tyler, 1982; Hendler, 1991; Mercier y Hamel, 2009), ya sea para las larvas o para la producción de las gametas. El desarrollo larval en *O. januarii* ocurre probablemente a través de una larva lecitotrófica, por lo cual este no sería un factor determinante para las larvas. En cuanto a la disponibilidad de alimento para los adultos, los ítems más frecuentes que conforman la dieta de *O. januarii* son fragmentos de algas y tricomas de plantas, los cuales han sido registrados en varios de los meses estudiados. Estos ítems estarían disponibles durante todo el año, por lo cual esta especie dispondría de una fuente de alimento constante en la población estudiada.

Una manera de asegurar el éxito de la fecundación es la agregación de individuos maduros y la sincronización del momento de liberación de gametas (Giese y Pearse, 1974). Este tipo de agregaciones han sido observadas para algunas especies de ofiuroideos (Himmelman *et al.*, 2008), aunque existen controversias sobre si se trata de un comportamiento social regular o efectivamente se trata de una estrategia con fines reproductivos (Hendler, 1991). Varios autores han registrado que los machos de algunas especies de ofiuroideos liberan las gametas primero, induciendo la subsiguiente liberación de oocitos en las hembras (Hendler, 1991; Mercier y Hamel, 2009).

El buen ajuste de las relaciones morfométricas de las partes mandibulares como estimadores del tamaño de los individuos permite realizar

estudios de crecimiento mediante marcado químico con calceína. Estas relaciones también han sido empleadas en estudios de crecimiento en otras especies, relacionando el tamaño corporal con los dientes, los escudos radiales y otras partes del cuerpo (Josefson, 1995; Medeiros-Bergen y Ebert, 1995; Dahm y Brey, 1998; Stewart, 2000). En el estudio de crecimiento realizado para *O. januarii* no se observó variación estacional, así como tampoco se observaron indicios de pulsos de crecimiento diferencial en los osículos vertebrales. Esta especie presenta un crecimiento continuo, más rápido durante la fase juvenil, y alcanzaría una edad teórica estimada de 18 años con un diámetro de disco final aproximado de 20,4 mm.

La relativa larga vida, 18 años, y la estrategia reproductiva harían de este ofiuroido un importante integrante de las comunidades bentónicas patagónicas, a través del reciclado de las partículas en suspensión y como vía energética en posibles cadenas alimentarias. A pesar de tener bajos valores caloríficos por gramo (Cummins y Wuycheck, 1971) los ofiuroides están incluidos en las dietas de varios taxones, como cangrejos ermitaños, estrellas de mar y peces (Blaber *et al.*, 1987). Si bien en la zona de estudio se han registrado moderadas densidades de individuos (Rodríguez, 2009), existen otras zonas del golfo San José y principalmente del golfo San Matías, donde *O. januarii* es miembro dominante de las comunidades bentónicas (Zaixso y Lizarralde, 2000; Martín Brogger, obs. pers.; Ricardo Vera, com. pers.)

La morfología general del cuerpo de *O. januarii*, y especialmente la morfología mandibular, presenta varias diferencias con respecto a las especies cogenéricas para las cuales existe información. Asimismo se han observado diferencias en cuanto a la estrategia alimentaria de esta especie comparada

con los registros existentes para otras especies de la familia Ophiolepididae. Serán necesarios futuros estudios que contemplen esta información con el fin de determinar la posición taxonómica de esta especie.

8- CONCLUSIONES FINALES

8. Conclusiones finales.

- El desarrollo de la placa dental y la formación de nuevos dientes ocurren en *Ophioplocus januarii* tanto en sentido ventral como dorsal, por primera vez descrito para un ofiuroideo, lo cual fue validado en los estudios de crecimiento. Mediante morfometría entre el tamaño del cuerpo y estructuras mandibulares es posible estimar el tamaño corporal en base a observaciones en las mandíbulas.

- *Ophioplocus januarii* es un ofiuroideo micrófago, que se alimenta de manera oportunista de partículas en suspensión de la interfase agua-sedimento, principalmente fragmentos de algas y tricomas de plantas. La microestructura del estereoma de sus dientes adopta una configuración intermedia entre los dientes mixtos de otras especies micrófagas y los dientes de las macrófagas, asemejándose a los de las primeras.

- En esta especie es posible realizar estudios de crecimiento mediante el uso del marcador químico calceína, siendo la mandíbula la parte del cuerpo que mejor describe el crecimiento. La tasa de crecimiento K en esta población es igual a 0,222 por año y con un largo infinito L_{∞} igual a 20,4 mm de diámetro de disco. La edad máxima calculada fue cercana a los 18 años.

- En la población estudiada se observa gametogénesis a lo largo de todo el año y la ausencia a nivel individual de estadios reproductivos definidos, resultando un tipo de reproducción continua, o al menos sin un ciclo definido. Las fluctuaciones en los valores del índice gonadal corresponden a variaciones en la cantidad de gametas y no a estadios distintos de desarrollo, siendo continua la liberación de las mismas.

9- BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía.

- Amoroso, R. 2003. Heterogeneidad espacial en la dinámica de la metapoblación de vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) del golfo San José. Tesis de grado, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn. 55 pp.
- Appeldoorn, R. 1987. Modification of a seasonally oscillating growth function for use with mark-recapture data. *Journal of the International Council for the Exploration of the Sea*, 43: 194-198.
- Averbuj, A. 2009. Biología reproductiva, crecimiento y dieta del caracol ciego *Buccinanops cochlidium* (Dillwyn, 1817) (Gastropoda: Nassariidae) en el golfo San José, Patagonia Argentina. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. 200 pp.
- Bartsch, I. 1982. Ophiuroidea (Echinodermata) from the Patagonian shelf. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*, 79: 211-250.
- Bashey, F. 2004. A comparison of the suitability of Alizarin Red S and Calcein for inducing a nonlethally detectable mark in juvenile guppies. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133: 1516-1523.
- Bernasconi, I. 1965a. *Astrotoma agassizii* Lyman, especie vivípara del Atlántico sur. *Physis*, 25(69): 1-5.
- Bernasconi, I. 1965b. Ophiuroidea de Puerto Deseado (Santa Cruz, Argentina). *Physis*, 25(69): 143-152.
- Bernasconi, I. y M. M. D'Agostino. 1971. Ofiuroideos argentinos. Claves para los órdenes, subórdenes, familias, subfamilias y géneros. *Physis*, 30(81): 447-469.
- Bernasconi, I. y M. M. D'Agostino. 1974. Ampliación del área de distribución de *Amphiura crassipes* Ljungman, 1867 (Ophiuroidea, Amphiuridae). *Physis*, 33(86): 135-138.
- Bernasconi, I. y M. M. D'Agostino. 1975. Nueva especie de ofiuroideo argentino *Amphilepis sanmatiensis* sp. Nov. (Ophiuroidea, Amphilepididae). *Physis*, 34(89): 355-358.

- Bernasconi, I. y M. M. D'Agostino. 1977. Ofiuroideos del mar epicontinental Argentino. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, Hidrobiología, 5(5): 65-114.
- Bigatti, G. 2005. Anatomía, ecología y reproducción del caracol rojo *Odontocymbiola magellanica* (Gastropoda: Volutidae) en golfos norpatagónicos. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. 185 pp.
- Blaber, S. J. M., J. L. May, J. W. Young y C. M. Bulman. 1987. Population density and predators of *Ophiacantha fidelis* (Koehler, 1930) (Echinodermata: Ophiuroidea) on the Continental Slope of Tasmania. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 38: 243-247.
- Boos, K. 2008. Dental insights into ophiuroids. 4th workshop of German, Swiss and Austrian Echinoderm Research. Vienna, Austria, octubre de 2008.
- Borges, M., L. Q. Yokoyama y A. C. Z. Amaral. 2009. Gametogenic cycle of *Ophioderma januarii*, a common Ophiodermatidae (Echinodermata: Ophiuroidea) in southeastern Brazil. Zoologia, 26(1): 118-126.
- Brey, T. 1998. Growth performance and mortality in aquatic macrobenthic invertebrates. Advances in Marine Biology, 35: 153-243.
- Brey, T. 2001. Population dynamics in benthic invertebrates. A virtual handbook. <http://www.thomas-brey.de/science/virtualhandbook> Versión 01.2.
- Brey, T., J. Pearse, L. Basch, J. McClintock y M. Slattery. 1995. Growth and production of *Sterechinus neumayeri* (Echinoidea: Echinodermata) in McMurdo Sound, Antarctica. Marine Biology, 124: 279-292.
- Brogger, M. I., M. I. Martínez y P. E. Penchaszadeh. 2010. Reproduction of the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinoidea: Arbaciidae) from Golfo Nuevo, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 90(7): 1405-1409.
- Brooks, R. C., R. C. Heidinger y C. C. Kohler. 1994. Mass-marking otoliths of larval and juvenile walleyes by immersion in Oxytetracycline, Calcein, or

- Calcein blue. North American Journal of Fisheries Management, 14: 143-150.
- Byrne, M. 1989. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the ovoviviparous ophiuroid *Ophiolepis paucispina* (Echinodermata). Biological Bulletin, 176: 79-95.
- Byrne, M., P. Cisternas y T. O'Hara. 2008. Brooding of pelagic-type larvae in *Ophiopeza spinosa*: reproduction and development in a tropical ophiodermatid brittlestar. Invertebrate Biology, 127(1): 98-107.
- Campana, S. E. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. Journal of Fish Biology, 59: 197-242.
- Charlina, N. A., I. Y. Dolmatov e I. C. Wilkie. 2009. Juxtaligamental system of the disc and oral frame of the ophiuroid *Amphipholis kochii* (Echinodermata: Ophiuroidea) and its role in autotomy. Invertebrate Biology, 128(2): 145-156.
- Chia, F. y C. W. Walker. 1991. Echinodermata: Asteroidea. En: Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. VI. Giese, Pearse & Pearse (Eds.). Boxwood Press, Pacific Grove, CA. Pp. 301-353.
- Chia, F., D. Atwood y B. Crawford. 1975. Comparative morphology of echinoderm sperm and possible phylogenetic implications. American Zoologist, 15: 533-565.
- Clark, H. L. 1914. Growth-changes in brittle-stars. Papers from the Tortugas Laboratory of the Carnegie Institution of Washington, 5(7): 91-126.
- Cummins, W. K. y W. J. C. Wuycheck. 1971. Caloric equivalents for investigations in ecological energetics. Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, 18: 101-106.
- Dahm, C. 1993. Growth, production and ecological significance of *Ophiura albida* and *O. ophiura* (Echinodermata: Ophiuroidea) in the German Bight. Marine Biology, 116: 431-437.
- Dahm, C. 1996. Ökologie und populationsdynamik antarktischer Ophiuroiden (Echinodermata). Berichte zur Polarforschung, 194: 1-289.

- Dahm, C. 1999. Ophiuroids (Echinodermata) of southern Chile and the Antarctic: Taxonomy, biomass, diet and growth of dominant species. *Scientia Marina*, 63(1): 427-432.
- Dahm, C. y T. Brey. 1998. Determination of growth and age of slow-growing brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) from natural growth bands. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 78: 941-951.
- Davoult, D. y F. Gounin. 1995. Suspension-feeding activity of a dense *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) population at the water-sediment interface: Time coupling of food availability and feeding behaviour of the species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 41: 567-577.
- Dearborn, J. H. 1977. Foods and feeding characteristics of Antarctic asteroids and ophiuroids. En: Llano (Ed.), *Adaptations within Antarctic ecosystems*. Proc 3rd SCAR Symp Antarct Biol. Smithsonian Institution, Washington DC. Pp. 293-326.
- Dearborn, J. H., G. Hendler y K. C. Edwards. 1996. The diet of *Ophioparte gigas* (Echinodermata: Ophiuroidea) along the Antarctic Peninsula, with comments on its taxonomic status. *Polar Biology*, 16: 309-320.
- Diehl, H. y J. L. Ellingboe. 1965. Indicator for triation of calcium in presence of magnesium using disodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate. *Analytical Chemistry*, 28(5): 882-884.
- Duque, C., J. Rojas, S. Zea, A. J. Roccatagliata, M. S. Maier y A. M. Seldes. 1997. Main sterols from the ophiuroids *Ophiocoma wendtii*, *Ophiocoma echinata*, *Ophioplocus januarii* and *Ophionotus victoriae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(8): 775-778
- Falkner, I. y M. Byrne. 2003. Reproduction of *Ophiactis resiliens* (Echinodermata: Ophiuroidea) in New South Wales with observations on recruitment. *Marine Biology*, 143: 459-466.
- Fell, H. B. 1966. The ecology of ophiuroids. En: Boolootian (Ed.). *Physiology of Echinodermata*. Interscience, Nueva York. Pp. 129-143.

- Fenaux, L. 1970. Maturation of the gonads and seasonal cycle of the planktonic larvae of the ophiuroid *Amphiura chiajei* Forbes. Biological Bulletin, 138: 262-271.
- Fernández, M., D. Hernández y A. Roux. 2007. Distribución espacial del langostino patagónico (*Pleoticus muelleri*, Bate, 1888) y su relación con las variables ambientales, Golfo San Jorge, Argentina. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 42(3): 335-344.
- Ferrari, F. D. y J. H. Dearborn. 1989. A second examination of predation on pelagic copepods by the brittle star *Astrotoma agassizii*. Journal of Plankton Research, 11(6): 1315-1320.
- Gage, J. D. 1990. Skeletal growth bands in brittle stars: microstructure and significance as age markers. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 70: 209-224.
- Gage, J. D. 2003. Growth and production of *Ophiocten gracilis* (Ophiuroidea: Echinodermata) on the Scottish continental slope. Marine Biology, 143: 85-97.
- Gage, J. D. y P. A. Tyler. 1981. Re-appraisal of age composition, growth and survivorship of the deep-sea brittle star *Ophiura ljunghmani* from size structure in a sample time series from the Rockall Trough. Marine Biology, 64: 163-172.
- Gage, J. D. y P. A. Tyler. 1982. Depth-related gradient in size structure and the bathymetric zonation of deep-sea brittle stars. Marine Biology, 71: 299-308.
- Gage, J. D., R. M. Anderson, P. A. Tyler, R. Chapman y E. Dolan. 2004. Growth, reproduction and possible recruitment variability in the abyssal brittle star *Ophiocten hastatum* (Ophiuroidea: Echinodermata) in the NE Atlantic. Deep-Sea Research, 51: 849-864.
- Gielazyn, M. L., S. E. Stancyk y W. W. Piegorsch. 1999. Experimental evidence of subsurface feeding by the burrowing ophiuroid *Amphipholis gracillima* (Echinodermata). Marine Ecology Progress Series, 184: 129-138.

- Giese, A. C. y H. Kanatani. 1987. Maturation and spawning. En: *Reproduction of Marine Invertebrates*, Vol. IX, Giese, Pearse & Pearse (Eds.). Blackwell Scientific Publications and The Boxwood Press, CA. Pp. 251-329.
- Giese, A. C. y J. S. Pearse. 1974. Introduction: general principles. En: *Reproduction of Marine Invertebrates*, Vol. IX, Giese, Pearse & Pearse (Eds.), The Boxwood Press, Pacific Grove. Pp. 251-329.
- Giese, A. C., J. S. Pearse y V. B. Pearse. 1991. *Reproduction of marine invertebrates*. Vol. 6. Echinoderms and Lophophorates. The Boxwood Press. Pacific Grove, CA. 808 pp.
- Grange, L. J., P. A. Tyler, L. S. Peck y N. Cornelius. 2004. Long-term interannual cycles of the gametogenic ecology of the Antarctic brittle star *Ophionotus victoriae*. *Marine Ecology Progress Series*, 278: 141-155.
- Guille, A. 1964. Contribution à l'étude de la systématique et de l'écologie d'*Ophiothrix quinquemaculata* d. Ch. *Vie et Milieu*, 15: 243-308.
- Gulland, J. A. y S. J. Holt. 1959. Estimation of growth parameters for data at unequal time intervals. *Journal of the International Council for the Exploration of the Sea*, 25(1): 47-49.
- Hagman, D. K. y P. D. Vize. 2003. Mass spawning by two brittle star species, *Ophioderma rubicundum* and *O. squamosissimum* (Echinodermata: Ophiuroidea), at the Flower Garden Banks, Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 72(3): 871-876.
- Haller, M. J., A. J. Monti y C. M. Meister. 2001. Hoja Geológica 4363-I: Península Valdés, Provincia de Chubut. En: Programa Nacional de Cartas Geológicas de la República Argentina. Secretaría de Energía y Minería, Servicio Geológico Minero Argentino, Buenos Aires, Argentina. Pp. 1-34.
- Hansson, H. 2009. Ophiuroidea. Accedido mediante: World Register of Marine Species en <http://www.marinespecies.org> (04-06-2010).
- Harris, J. L., K. MacIsaac, K. D. Gilinson y E. L. Kenchington. 2009. Feeding biology of *Ophiura sarsii* Lütken, 1855 on Banquereau bank and the effects of fishing. *Marine Biology*, 156(9): 1891-1902.

- Hendler, G. 1979. Sex-reversal and viviparity in *Ophiolepis kieri*, n.sp., with notes on viviparous brittlestars from the Caribbean (Echinodermata: Ophiuroidea). Proceedings of the Biological Society of Washington, 92: 783-795.
- Hendler, G. 1982. The feeding biology of *Ophioderma brevispinum* (Ophiuroidea: Echinodermata). En: International Echinoderm Conference, Lawrence (Ed.), Tampa Bay, Balkema. Pp. 21-27.
- Hendler, G. 1991. Echinodermata: Ophiuroidea. En: Giese, Pearse & Pearse (Eds.). Reproduction of marine invertebrates, vol. VI. Echinoderms and Lophophorates. Boxwood Press, Pacific Grove, California. Pp. 351-511.
- Hendler, G. y J. Miller. 1984. Feeding behavior of *Asteroporpa annulata*, a gorgonocephalid brittlestar with unbranched arms. Bulletin of Marine Science, 34(3): 449-460.
- Hendler, G. y L. U. Tran. 2001. Reproductive biology of a deep-sea brittle star *Amphiura carchara* (Echinodermata: Ophiuroidea). Marine Biology, 138: 113-123.
- Hendler, G., J. E. Miller, D. L. Pawson y P. M. Kier. 1995. Sea stars, sea urchins, and allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press, Washington. 300 pp.
- Herrmann, M., M. L. Lepore, J. Laudien, W. E. Arntz y P. E. Penschaszadeh. 2009. Growth estimations of the Argentinean wedge clam *Donax hanleyanus*: A comparison between length-frequency distribution and size-increment analysis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 379(1-2): 8-15.
- Hensley, R. T., J. A. Beardmore y P. A. Tyler. 1995. Genetic variance in *Ophiomusium lymani* (Ophiuroidea: Echinodermata) from lower bathyal depths in the Rockall Trough (northeast Atlantic). Marine Biology, 121: 469-475.
- Himmelman, J. H., C. P. Dumont, C. F. Gaymer, C. Vallières y D. Drolet. 2008. Spawning synchrony and aggregative behaviour of cold-water

- echinoderms during multi-species mass spawning. Marine Ecology Progress Series, 361: 161-168.
- Hyman, L. H. 1955. The Invertebrates: Echinodermata. Vol. IV. McGraw-Hill, Nueva York, Estados Unidos. 763 pp.
- Irimura, S., y T. Fujita. 2003. Interspecific variation of vertebral ossicle morphology in the Ophiuroidea. En: Echinoderm Research 2001, Féral & David (Eds.), Swetz & Zeillinger, Lisse. Pp. 161-167.
- Josefson, A. B. 1995. Large-scale estimate of somatic growth in *Amphiura filiformis* (Echinodermata: Ophiuroidea). Marine Biology, 124: 435-442.
- Kaehler, S., y C. D. McQuaid. 1999. Use of the fluorochrome calcein as an *in situ* growth marker in the brown mussel *Perna perna*. Marine Biology, 133: 455-460.
- Komatsu, M. y T. Shosaku. 1993. Development of the brittle star, *Ophioplocus japonicus* H. L. Clark. Zoological Science, 10: 295-306.
- Lawrence, J. M. y J. Herrera. 2000. Stress and deviant reproduction in echinoderms. Zoological Studies, 39(3): 151-171.
- LeClair, E. E. 1994. Quantitative morphological variation in the vertebral ossicles of the Ophiuræ (Ophiuroidea). En: David, Guille, Féral & Roux (Eds.). Echinoderms through time. Balkema, Rotterdam. Pp. 443-448.
- LeClair, E. E. 1996. Arm joint articulations in the ophiuran brittlestars (Echinodermata: Ophiuroidea): a morphometric analysis of ontogenetic, serial, and interspecific variation. Journal of Zoology, 240: 245-275.
- LeClair, E. E. y M. C. LaBarbera. 1997. An *in vivo* comparative study of intersegmental flexibility in the ophiuroid arm. Biological Bulletin, 193: 77-89.
- Lefebvre, A., D. Davoult, F. Gentil y M. A. Janquin. 1999. Spatio-temporal variability in the gonad growth of *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata: Ophiuroidea) in the English Channel and estimation of carbon and nitrogen outputs towards the pelagic system. Hydrobiologia, 414: 25-34.

- Lepore, M. L., P. E. Penchaszadeh, J. E. F. Alfaya y M. Herrmann. 2009. Aplicación de calceína para la estimación del crecimiento de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* Reeve, 1854. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(3): 767-774.
- Litvinova, N. M. 1994. The life forms of Ophiuroidea (based on the morphological structures of their arms). En: *Echinoderms Through Time, Proceedings of the 8th International Echinoderm Conference*, Dijon, Francia. Pp. 449-454.
- Lyman, T. 1865. Ophiuroidea and Astrophytidae. *Illustrated Catalogue of the Museum of Comparative Zoology of Harvard*, 1: 1-200.
- Manjón-Cabeza, M. E. y A. Ramos. 2003. Ophiuroid community structure of the South Shetland Islands and Antarctic Peninsula region. *Polar Biology*, 26: 691-699.
- Marzinelli, E. M., G. Bigatti, J. Giménez y P. E. Penchaszadeh. 2006. Reproduction of the sea urchin *Pseudechinus magellanicus* (Echinoidea : Temnopleuridae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Bulletin of Marine Science*, 79(1): 127-136.
- Mashanov, V. S., N. A. Charlina, I. Y. Dolmatov e I. C. Wilkie. 2007. Juxtaligamental cells in the arm of the brittlestar *Amphipholis kochii* Lütken, 1872 (Echinodermata: Ophiuroidea). *Russian Journal of Marine Biology*, 33(2): 110-117.
- McClintock, J. B., T. Hopkins, K. Marion, S. Watts y G. Schinner. 1993. Population structure, growth and reproductive biology of the gorgonocephalid brittlestar *Asteroporpa annulata*. *Bulletin of Marine Science*, 52(3): 925-936.
- Matsumoto, H. 1915. A new classification of the Ophiuroidea: with descriptions of new genera and species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 67: 43-92.
- Medeiros-Bergen, D. E. 1996. On the stereom microstructure of ophiuroid teeth. *Ophelia*, 45(3): 211-222.

- Medeiros-Bergen, D. E. y T. A. Ebert. 1995. Growth, fecundity and mortality rates of two intertidal brittlestars (Echinodermata: Ophiuroidea) with contrasting modes of development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189: 47-64.
- Mercier, A. y J. F. Hamel. 2009. Endogenous and exogenous control of gametogénesis and spawning in echinoderms. *Advances in Marine Biology*, 55: 1-291.
- Mercier, A., R. H. Ycaza y J. F. Hamel. 2007. Long-term study of gamete release in a broadcast-spawning holothurian: Predictable lunar and diel periodicities. *Marine Ecology Progress Series*, 329: 179-189.
- Mladenov, P. V. 1976. Reproduction and larval development in ophiuroids (Echinodermata) of Barbados, West Indies. Tesis de maestría, Universidad McGill. 136 pp.
- Mladenov, P. V. 1983. Breeding patterns of three species of Caribbean brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *Bulletin of Marine Science*, 33(2): 363-372.
- Moloney, P. y M. Byrne. 1994. Histology and ultrastructure of the ovary and oogenesis in the ophiuroid *Ophionereis schyeri*. En: *Echinoderms through time*, Guille, Féral & Roux (Eds.), Balkema, Rotterdam. Pp. 463-469.
- Monaghan, J. P. 1993. Comparison of calcein and tetracycline as chemical markers in Summer Flounder. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122: 298-301.
- Morán, A. L. 2000. Calcein as a marker in experimental studies newly-hatched gastropods. *Marine Biology*, 137: 893-898.
- Morrison, G. W. 1979. Studies on the ecology of the sub-Antarctic ophiuroid *Ophionotus hexactis* (E. A. Smith). Tesis de maestría, Universidad de Londres. Pp. 213.
- Munday, B. W. y B. F. Keegan. 1992. Population dynamics of *Amphiura chiajei* (Echinodermata: Ophiuroidea) in Killary Harbour, on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 114: 595-605.

- Murakami, S. 1963. The dental and oral plates of Ophiuroidea. Transactions of the Royal Society of New Zealand, 4(1): 1-48.
- Patent, D. H. 1969. The reproductive cycle of *Gorgonocephalus caryi* (Echinodermata: Ophiuroidea). Biological Bulletin, 136: 241-252.
- Patent, D. H. 1976. Gonadal histology of the basket star, *Gorgonocephalus eucnemis*. Thalassia Jugoslavica, 12: 269-276.
- Pearse, J. S., R. Mooi, S. J. Lockhart y A. Brandt. 2009. Brooding and species diversity in the Southern Ocean: selection for brooders or speciation within brooding clades? En: Smithsonian at the Poles. Contributions to International Polar Year Science, Krupnik, Lang & Miller (Eds.), Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington. Pp. 181-196.
- Pearson, M. y J. D. Gage. 1984. Diets of some deep-sea brittle stars in the Rockall Trough. Marine Biology, 82: 247-258.
- Penchaszadeh, P. E. 1973. Comportamiento trófico de la estrella de mar *Astropecten brasiliensis*. Ecología, 1(1): 45-54.
- Pérez, A. F., C. Boy, E. Morriconi y J. Calvo. 2010. Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. Polar Biology, 33(3): 271-280.
- Pomory, C. M. y M. T. Lares. 2000. Rate of regeneration of two arms in the field and its effect on body components in *Luidia clathrata* (Echinodermata: Asteroidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 254: 211-220.
- Pomory, C. M. y J. M. Lawrence. 1999a. Effect of arm regeneration on energy storage and gonad production in *Ophiocoma echinata* (Echinodermata: Ophiuroidea). Marine Biology, 135: 57-63.
- Pomory, C. M. y J. M. Lawrence. 1999b. Energy content of *Ophiocoma echinata* (Echinodermata: Ophiuroidea) maintained at different feeding levels during arm regeneration. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 238: 139-150.

- Pomory, C. M. y J. M. Lawrence. 2001. Arm regeneration in the field in *Ophiocoma echinata* (Echinodermata: Ophiuroidea): effects on body composition and its potential role in a reef food web. *Marine Biology*, 139: 661-670.
- Purcell, S. W., B. F. Blockmans y W. J. Nash. 2006. Efficacy of chemical and physical tags for large-scale release of an exploited holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 334: 283-293.
- Quiroga, E. y J. Sellanes. 2009. Growth and size-structure of *Stegophiura* sp. (Echinodermata: Ophiuroidea) on the continental slope off central Chile: a comparison between cold seep and non-seep sites. *Journal of the Biological Association of the United Kingdom*, 89(2): 421-428.
- Roccatagliata, A. J., M. S. Maier, A. M. Seldes, C. A. Pujol y E. B. Damonte. 1996. Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *Journal of Natural Products*, 59: 887-889.
- Rodríguez, M. S., P. E. Penchaszadeh y M. I. Brogger. 2008. Chemical tagging assay on the ophiuroid *Ophioplocus januarii* growth. Fifth North American Echinoderm Conference. Melbourne, Florida, Estados Unidos.
- Rodríguez, M. S. 2009. Estudios de crecimiento en el ofiuroido *Ophioplocus januarii* (Echinodermata: Ophiuroidea) del Golfo San José, Patagonia. Tesis de licenciatura, Universidad CAECE, Buenos Aires. 57 pp.
- Rowley, R. J. y D. I. Mackinnon. 1995. Use of the fluorescent marker calcein in biomineralisation studies of brachiopods and other marine organisms. *Bulletin de l'Institut Oceanographique*, 14: 111-120.
- Rubilar, T., C. T. Pastor de Ward y M. E. Díaz de Vivar. 2005. Sexual and asexual reproduction of *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in Golfo Nuevo. *Marine Biology*, 146: 1083-1090.
- Russell, M. P. y R. W. Meredith. 2000. Natural growth lines in echinoid ossicles are not reliable indicators of age: a test using *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebrate Biology*, 119(4): 410-420.
- Schoener, A. 1972. Fecundity and possible mode of development of some deep-sea ophiuroids. *Limnology and Oceanography*, 17(2): 193-199.

- Selvakumaraswamy, P. y M. Byrne. 1995. Reproductive cycle of two populations of *Ophionereis schayeri* (Ophiuroidea) in New South Wales. *Marine Biology*, 124: 85-97.
- Selvakumaraswamy, P. y M. Byrne. 2000. Reproduction, spawning, and development of 5 ophiuroids from Australia and New Zealand. *Invertebrate Biology*, 119(4): 394-402.
- Selvakumaraswamy, P. y M. Byrne. 2004. Metamorphosis and developmental evolution in *Ophionereis* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine Biology*, 145: 87-99.
- Selvakumaraswamy, P. y M. Byrne. 2006. Evolution of larval form in ophiuroids: insights from the metamorphic phenotype of *Ophiothrix* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Evolution & Development*, 8(2): 183-190.
- Sides, E. M. y J. D. Woodley. 1985. Niche separation in three species of *Ophiocoma* (Echinodermata: Ophiuroidea) in Jamaica, West Indies. *Bulletin of Marine Science*, 36(3): 701-715.
- Singletary, R. 1980. The biology and ecology of *Amphioplus coniertodes*, *Ophionephthys limicola*, and *Micropholis gracillima* (Ophiuroidea: Amphiuridae). *Caribbean Journal of Science*, 16(1-4): 39-55.
- Sköld, M., A. B. Josefson y L. O. Loo. 2001. Sigmoidal growth in the brittle star *Amphiura filiformis* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine Biology*, 139: 519-526.
- Smith, J. E. 1940. The reproductive system and associated organs of the brittle-star *Ophiothrix fragilis*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 132: 267-309.
- Smith, A. B., G. L. J. Paterson y B. Lafay. 1995. Ophiuroid phylogeny and higher taxonomy: morphological, molecular and palaeontological perspectives. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 114: 213-243.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman, Nueva York, 776 pp.

- Soong, K., Y. Shen, S. H. Tseng y C. P. Chen. 1997. Regeneration and potential differentiation of arms in the brittlestar, *Ophiocoma scolopendria* (Lamarck) (Echinodermata: Ophiuroidea). *Zoological Studies*, 36: 90-97.
- Spencer, W. K. 1925. A monograph of the British palaeozoic Asterozoa. Parte VI. The Paleontographical Society of London, 237-324.
- Spencer, W. K. y C. W. Wright. 1966. Asterozoans. En: Moore (Ed.). *Treatise on invertebrate paleontology*. Univ. of Kansas Press, Nueva York. Pp. 5-107.
- Stancyk, S. E. 1974. Life history patterns of three estuarine brittlestars (Ophiuroidea) at Cedar Key, Florida. Tesis doctoral, Universidad de Florida, Gainesville, Florida.
- Stancyk, S. E. 1975. The life history pattern of *Ophiothrix angulata* (Ophiuroidea). *American Zoologist*, 15: 793.
- Stewart, B. 1995. Use of the fluorescent marker calcein for biomineralisation studies of the snake star *Astrobrachion constrictum* (Echinodermata: Ophiuroidea). En: *Echinoderm Research 1995*, Emson, Smith & Campbell (Eds.), Balkema, Rotterdam. Pp. 277-281.
- Stewart, B. 2000. Anatomical features of the euryalid snake star *Astrobrachion constrictum* (Ophiuroidea: Asteroschematidae). *Invertebrate Biology*, 119(2): 222-233.
- Stewart, B. G. y P. V. Mladenov. 1995. Reproductive periodicity in the euryalinid snake star *Astrobrachion constrictum* in a New Zealand fiord. *Marine Biology*, 123: 543-553.
- Stewart, B. G. y P. V. Mladenov. 1997. Population structure, growth and recruitment of the euryalinid brittle-star *Astrobrachion constrictum* (Echinodermata: Ophiuroidea) in Doubtful Sound, Fiordland, New Zealand. *Marine Biology*, 127: 687-697.
- Stöhr, S. y D. Muths. 2010. Morphological diagnosis of two genetic lineages of *Acronida brachiata* (Echinodermata: Ophiuroidea), with description of a new species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(4): 831-843.

- Stöhr, S. y T. O'Hara. 2010. World Ophiuroidea database. Accedido mediante: World Register of Marine Species en <http://www.marinespecies.org/>
- Strathmann, R. R. 1978. The evolution and loss of feeding larval stages of marine invertebrates. *Evolution*, 32: 894-906.
- Sumida, P. Y. G., P. A. Tyler, R. S. Lampitt y J. D. Gage. 2000. Reproduction, dispersal and settlement of the bathyal ophiuroid *Ophiocten gracilis* in the NE Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 137: 623-630.
- Sun, T. C., S. Mori, J. Roper, C. Brown, T. Hooser y D. B. Burr. 1992. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone*, 13: 443-446.
- Thomas, L. P. 1975. The systematic relationships of *Ophioplocus*, *Ophioceramis*, and *Ophioceres* (Echinodermata, Ophiuroidea). *Bulletin of Marine Science*, 25(2): 232-247.
- Tommasi, L. R. 1968. Os Ofiuroides existentes nas coleções do Museu de Buenos Aires coletados de La Plata até 42° S. *Papéis avulsos de Zoologia*, 21(11): 115-124.
- Walker, C. W. 1982. Nutrition of gametes. En: *Echinoderm Nutrition*, Jangoux & Lawrence (Eds.), Balkema, Rotterdam. Pp. 449-468.
- Warner, G. 1982. Food and feeding mechanisms: Ophiuroidea. En: *Echinoderm Nutrition*. Balkema, Rotterdam. Pp. 161-181.
- Yamashita, M. 1986. *In-vitro* maturation of the brittle-star *Amphipholis kochii* oocytes induced by cyclic AMP. *Zoological Science*, 3: 467-478.
- Yamashita, M. 1988. Involvement of cyclic AMP in initiating maturation of the brittle-star *Amphipholis kochii* oocytes: Induction of oocyte maturation by inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase and activators of adenylate cyclase. *Developmental Biology*, 125: 109-114.
- Yamashita, M. y F. Iwata. 1983. A quantitative analysis of the annual testicular cycle of the brittle-star *Amphipholis kochii* by means of autoradiographic investigation. *Biological Bulletin*, 164: 327-340.

- Yokoyama, L. Q. y A. C. Z. Amaral. 2008. The diet of *Ophionereis reticulata* (Echinodermata: Ophiuroidea) in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoología*, 25(3): 576-578.
- Zaixso, H. E. y Z. Lizarralde. 2000. Distribución de equinodermos en el golfo San José y sur del golfo San Matías (Chubut, Argentina). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 35(2): 127-145.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, 663 pp.

10- APÉNDICES

10. Apéndices.

Apéndice 1

Clasificación de la clase Ophiuroidea propuesto por Smith *et al.* (1995), modificado por Hansson (2009) y por Stöhr y O'Hara (2010).

Clase **Ophiuroidea** Gray, 1840

Orden **Euryalida** Lamarck, 1816

Familia **Asteronychidae** Müller & Troschel, 1840

Familia **Asteroschematidae** Verrill, 1899

Familia **Euryalidae** Gray, 1840

Familia **Gorgonocephalidae** Ljungman, 1867

Orden **Ophiurida** Müller & Troschel, 1840

Suborden **Ophiomyxina** Fell, 1962

Familia **Ophiomyxidae** Ljungman, 1867

Suborden **Ophiurina** Müller & Troschel, 1840

Familia **Ophiacanthidae** Perrier, 1891

Infraorden **Chillophiurina** Matsumoto, 1915

Familia **Ophiuridae** Lyman, 1865

Infraorden **Gnathophiurina** Matsumoto, 1915

Familia **Amphilepididae** Matsumoto, 1915

Familia **Amphiuridae** Ljungman, 1867

Familia **Ophiactidae** Matsumoto, 1915

Familia **Ophiocomidae** Ljungman, 1867

Familia **Ophionereididae** Ljungman, 1867

Familia **Ophiotrichidae** Ljungman, 1867

Infraorden **Hemieuryalina** Verrill, 1899

Familia **Hemieuryalidae** Verrill, 1899

Infraorden **Ohiodermatina** Smith *et al.*, 1995

Familia **Ophiochitonidae** Matsumoto, 1915

Familia **Ophiodermatidae** Ljungman, 1867

Infraorden **Ophiolepidina** Ljungman, 1867

Familia **Ophiolepididae** Ljungman, 1867

Apéndice 2

Distribución de las tallas oocitarias para cada hembra.

