



**Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco**

Facultad de Ciencias Naturales

Departamento de Biología General



**“Reproducción y ecología trófica del opistobranquio  
*Pleurobranchaea* sp. en Golfo Nuevo, Chubut”**

Tesis doctoral para acceder al título de Doctora en el área de Ciencias Biológicas

**Autora:** Lic. Verena Diana Bökenhans

**Director:** Dr. Andrés Averbuj

**Co-director:** Dr. José Elías Fernández Alfaya

2020

# AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por el otorgamiento de la beca doctoral, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

Al IBIOMAR - CCT CONICET -CENPAT por prestarme las instalaciones donde llevar a cabo este trabajo.

Al personal técnico de CCT CONICET-CENPAT quienes siempre estuvieron predisuestos a ayudarme. A Facu, Bocha, Bebo, Andrés, Fabi y Nestor por hacer posibles mis campañas, Mariano y Angie por la ayuda en los acuarios, Norberto por el asesoramiento y acompañamiento en las técnicas de microscopía y Marcelo por su aporte en técnicas histológicas.

A Padi Foundation por el otorgamiento de un subsidio que ayudo a financiar parte de este trabajo.

A la FCNYCS de la UNPSJB por abrirme sus puertas brindándome la posibilidad de realizar tanto mi licenciatura como mi Tesis de doctorado.

A Aluar S.A. y al técnico Mauricio Luquet, por brindarme la posibilidad de trabajar con el microscopio electrónico de barrido.

A Andrés, mi director, por su buena predisposición, el acompañamiento a las campañas, por transmitirme su conocimiento y el empuje en los momentos que eran necesarios.

A José, mi co-director, por el acompañamiento, asesoramiento, consejos y correcciones.

A David Galván por el asesoramiento y acompañamiento con las técnicas de isótopos estables.

A Sebastián Giulianelli por el asesoramiento y la logística realizada y al Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires) para poder llevar a cabo la técnica de TUNEL.

A Paula Raffo y Gabriela Casas por el acompañamiento con el reconocimiento de algas, así como a Maria Emilia Diez, Javier Signorelli, Virgínia Lo Russo y Luján Villanueva Gomila por su ayuda en el reconocimiento de fauna marina.

A todo el LARBIM por ser un hermoso grupo de trabajo, siempre predispuesto a ayudar. Por prestarme el espacio y los materiales para poder realizar este trabajo, así como por la ayuda en las campañas. En particular a Grego por abrirme las puertas y dejarme formar parte de este grupo de trabajo, siempre con una sonrisa y buen humor.

A mis compañeros de oficina por los mates, las charlas, las risas, los llantos, el aguante y bancarse mi ciclotimia cotidiana. En particular a Lore quien me ayudó con las correcciones finales del manuscrito.

A Juli Pontones, por salvarme de las inundaciones y compartir las trapeadas.

A mis hijas, porque nada sería igual sin ustedes. Ambas andan cantando por la vida con alegría y guardan increíbles cantidades de amor, bienestar y felicidad en envases tan pequeños. Tienen la capacidad de sacarme una sonrisa en medio de las adversidades. Nuestra cotidianidad es la que me hace fuerte. Luna, Maia las amo inmensamente.

A mi hermana, la Vane!!! Mi complemento. Mi compañera en todas y por siempre. Mi mayor confidente. Por estar siempre y bancarme en todas, por alegrarme la vida.

A mi viejo y mi vieja por estar siempre! Ma, gracias por la compañía, los abrazos y el aguante constante, por el abuelar inigualable lleno de amor y compromiso. Por transformarme en quien soy y por esta vida hermosa que me regalaste y que enriqueces día a día. Te amo! Papi, gracias por acompañarme a pesar de la distancia. Por llamarme y ayudarme siempre que lo necesité, por transmitirme el amor al viaje y a la naturaleza, te amo.

A Claudia y Roberto por formar parte de esta familia y el apoyo que siempre me brindan.

A todos mis amigos que siempre estuvieron, que me ayudaron, que me acompañaron, que me mimaron, me cuidaron, y recorrieron conmigo cortos o largos momentos de este hermoso camino. A todos los que llenaron mi alma y me marcaron en la vida:

A todos los que me olvido de nombrar pero influyeron en este hermoso trayecto de mi vida. Gracias!

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	i
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS .....	6
<i>Objetivo general</i> .....	6
<i>Objetivos específicos</i> .....	6
METODOLOGÍA GENERAL.....	8
<i>Área de estudio</i> .....	8
<i>Muestras</i> .....	9
<i>Procesamiento de las muestras</i> .....	12
Preparaciones histológicas para microscopía óptica .....	15
Preparaciones histológicas para microscopía electrónica de barrido (MEB).....	16
CAPÍTULO I: REPRODUCCIÓN Y CICLO GAMETOGÉNICO.....	17
<i>Introducción</i> .....	18
<i>Materiales y métodos</i> .....	20
1. Evento de cópula .....	20
2. Estructura gonadal.....	21
3. Madurez reproductiva y ciclo gametogénico .....	21
Madurez reproductiva .....	21
Ciclo gametogénico.....	21
Desorganización en los acinos .....	22
4. Deterioro de los acinos.....	22
Apoptosis en la gónada durante el ciclo de vida .....	23
5. Ciclo de vida anual.....	23
<i>Resultados</i> .....	23
1. Evento de cópula .....	23
2. Estructura gonadal.....	25
3. Madurez reproductiva y ciclo gametogénico .....	30
Madurez reproductiva .....	30
Ciclo gametogénico.....	31

Desorganización en los acinos .....	37
4. Deterioro de los acinos .....	39
Apoptosis en la gónada durante el ciclo de vida .....	41
5. Ciclo de vida anual .....	43
<i>Discusión</i> .....	45
CAPÍTULO II: MASAS OVÍGERAS Y DESARROLLO EMBRIONARIO .....	51
<i>Introducción</i> .....	52
<i>Materiales y métodos</i> .....	54
1. Masas ovígeras .....	54
Descripción de la puesta.....	54
Estacionalidad reproductiva .....	55
2. Experiencia en acuario: Ensayo de inducción a la oviposición.....	55
3. Desarrollo embrionario .....	56
4. Experiencia en acuario: Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario .....	58
<i>Resultados</i> .....	60
1. Masas ovígeras .....	60
Descripción de la puesta.....	60
Estacionalidad reproductiva .....	64
2. Experiencias en acuario: Ensayo de inducción a la oviposición .....	65
3. Desarrollo embrionario .....	66
4. Experiencia en acuario: Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario .....	71
<i>Discusión</i> .....	72
CAPÍTULO III: DIETA Y ECOLOGÍA TRÓFICA.....	77
<i>Introducción</i> .....	78
<i>Materiales y métodos</i> .....	80
1. Estudio de dieta mediante métodos directos .....	80
Determinación del contenido estomacal.....	80
Observación de eventos de alimentación <i>in situ</i> .....	81
2. Estudio de dieta mediante métodos indirectos .....	82
Análisis de isótopos estables de <sup>13</sup> C y <sup>15</sup> N.....	82
Nivel trófico e influencia de algas en la dieta de <i>Pleurobranchaea maculata</i> .....	84
<i>Resultados</i> .....	86
1. Estudio de dieta mediante métodos directos .....	86
Determinación del contenido estomacal.....	86

Observación de eventos de alimentación <i>in situ</i> .....	89
2. Estudio de dieta mediante métodos indirectos .....	90
Análisis de isótopos estables de <sup>13</sup> C y <sup>15</sup> N.....	90
Nivel trófico e influencia de algas en la dieta de <i>Pleurobranchaea maculata</i> .....	91
<i>Discusión</i> .....	93
DISCUSIÓN GENERAL.....	98
CONCLUSIONES .....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	102
ANEXO.....	119

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Individuo y masa ovígera de <i>Pleurobranchaea maculata</i> en su nuevo hábitat (Golfo Nuevo, Chubut).....	3
Figura 2. Sitios de muestreo: playa Punta Este y naufragio Foliás (frente a playa Paraná) en el Golfo Nuevo. ....	8
Figura 3. A-B: Playa Punta Este con marea alta (A) y marea baja (B). C: Fondos marinos del sitio playa Punta Este durante un muestreo por transecta. C y D: Zonas de fondo rocoso con parches de arena. E: Fondo marino rocoso cubierto por el alga parda <i>Undaria pinnatifida</i> .....	10
Figura 4. Metodologías de muestreo. ....	12
Figura 5. Medidas morfométricas de individuos (A) y masa ovígera (B) de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . 13	
Figura 6. A: Acuario experimental con dos individuos por jaula. B: Sistema de recirculación cerrado. ...	14
Figura 7. Comportamiento reproductivo de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	25
Figura 8. Estructura gonadal de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	27
Figura 9. Estadios gametogénicos. ....	29
Figura 10. Madurez reproductiva ....	31
Figura 11. Ciclo espermatogénico anual. ....	33
Figura 12. Ciclo oogénico anual.....	34
Figura 13. Histogramas de frecuencias de tallas oocitarias mensuales.....	35
Figura 14. Histogramas de frecuencias de tallas oocitarias estacionales durante dos años de muestreo (octubre 2015 - julio 2017).....	36
Figura 15. Desorganización en los acinos gametogénicos de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	38
Figura 16. Porcentaje mensual promedio de desorganización gonadal observado en los acinos espermatogénicos de aquellos individuos que presentaron desorganización.....	39
Figura 17. Deterioro en los acinos gametogénicos de <i>Pleurobranchaea maculata</i> .....	40
Figura 18. Frecuencia absoluta mensual de individuos de <i>Pleurobranchaea maculata</i> post-reproductivos y con algún grado de desorganización en sus acinos espermatogénicos. ....	41
Figura 19. Evaluación de apoptosis celular mediante la técnica del TUNEL en tejido gonadal de individuos de <i>Pleurobranchaea maculata</i> de julio (A-C), noviembre (D-F), febrero (G-I) y abril (J-L). ....	42
Figura 20. Porcentaje promedio de individuos que presentan los acinos espermatogénicos (A) y los acinos oogénicos (B) maduros, inmaduros o post-reproductivos a lo largo del año comprendido entre los meses de octubre 2015 a septiembre 2016.....	44

Figura 21. Peso promedio de individuos que presentan los acinos espermatogénicos (A) y los acinos oogénicos (B) maduros, inmaduros o post-reproductivos a lo largo del año. Período de muestreo: Octubre 2015-Septiembre 2016.....	45
Figura 22. Medidas morfométricas embrionarias de <i>Pleurobranchaea maculata</i> .....	58
Figura 23. A- Contenedores de agua corriente en la cámara de temperatura controlada. B- Frascos con aireación inmersos en contenedor.....	59
Figura 25. Masas ovígeras de <i>Pleurobranchaea maculata</i> .....	62
Figura 26. Masa ovígera de <i>Pleurobranchaea maculata</i> .....	63
Figura 27. Masa ovígera de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . Fotografías MEB. ....	64
Figura 28. Número de masas ovígeras de <i>Pleurobranchaea maculata</i> encontradas en campo a lo largo del año comprendido entre mayo 2018 y abril 2019; se muestran también el fotoperiodo y temperatura del agua de mar para el mismo período. ....	65
Figura 29. Número de masas ovígeras de <i>Pleurobranchaea maculata</i> encontradas durante el ensayo de fotoperiodo en acuarios. ....	66
Figura 30. Largo promedio y desvío estándar del embrión de <i>Pleurobranchaea maculata</i> a lo largo del tiempo (días). Se detallan los estadios del desarrollo embrionario completo.....	67
Figura 31. Desarrollo embrionario de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	68
Figura 32. Embriones en estadio pediveliger de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	70
Figura 33. Porcentaje de ocurrencia (O%) de ítems presas animales (negro) y algas (blanco) encontrados en el contenido estomacal de <i>Pleurobranchaea maculata</i> en ambos sitios de muestreo.....	86
Figura 34. Ejemplares encontrados en el contenido estomacal de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	88
Figura 35. Observaciones de alimentación <i>in situ</i> . ....	89
Figura 36. Representación gráfica de los valores de los isotopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	90
Figura 37. Contribución proporcional de cada grupo de presas a la dieta de <i>Pleurobranchaea maculata</i> , estimados mediante el modelo bayesiano de mezcla SIAR.....	91
Figura 38. Posiciones tróficas de ambos grupos de <i>Pleurobranchaea maculata</i> utilizando como línea de base al gasterópodo herbívoro <i>Tegula patagonica</i> y el bivalvo filtrador <i>Mytilus edulis</i> . ....	92
Figura 39. Elipses estándar ( $\text{SEA}_B$ ) calculadas para <i>Pleurobranchaea maculata</i> de hábitos costeros (negro) y de hábitos profundos (rojo). Los puntos representan los valores de los isotopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de <i>Pleurobranchaea maculata</i> de hábitos costeros (negro) y de hábitos profundos (rojo). ....	93

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios del desarrollo gonadal. ....	32
Tabla 2. Individuos inmaduros, maduros o post-reproductivos según sus características gonadales. ....	43
Tabla 3. Estadios del desarrollo intracapsular. ....	57
Tabla 4. Variables morfométricas del estadio embrionario veliger de <i>Pleurobranchaea maculata</i> . ....	69
Tabla 5. Tiempo (días) en completar el desarrollo embrionario, para cada masa ovígera a diferentes temperaturas. ....	71
Tabla 6. Porcentaje de ocurrencia (O%) de cada presa en los contenidos estomacales de <i>Pleurobranchaea maculata</i> para el sitio Punta Este (PE) y Folías (Fo) del Golfo Nuevo, Patagonia Argentina. ....	88

## RESUMEN

El opistobranquio *Pleurobranchaea maculata* es una especie invasora que actualmente se encuentra en expansión a lo largo de la costa Argentina. Desde su ingreso en 2009, ha sido reportado desde Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, hasta Bahía Camarones, provincia de Chubut. El objetivo general de esta Tesis es estudiar la biología reproductiva y la ecología trófica del opistobranquio *P. maculata* en Golfo Nuevo, Chubut. Las hipótesis que guiaron este estudio fueron: 1- La biología reproductiva de *P. maculata* favorece su establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina. 2- La ecología trófica de *P. maculata* favorece su establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina. Para ello se plantearon tres objetivos específicos: 1- Estudiar el comportamiento y mecanismos reproductivos de *P. maculata*, así como la estacionalidad y madurez reproductiva y relacionar el ciclo reproductivo con variables ambientales. 2- Describir las masas ovígeras y el desarrollo embrionario hasta la eclosión. Estimar la fecundidad individual y evaluar el efecto del fotoperiodo sobre la oviposición de *P. maculata* así como el efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario. 3- Describir la dieta y la trama trófica de *P. maculata* mediante técnicas directas e indirectas.

La biología reproductiva de la especie se estudió mediante un enfoque múltiple de observaciones directas a campo y experiencias en acuarios, técnicas histológicas clásicas, microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB), de modo de comprender aspectos de su ciclo de vida. Complementariamente, mediante la técnica de TUNEL (del inglés *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*), se identificaron los tipos celulares que sufren apoptosis durante la gametogénesis. El estudio del período de oviposición, estructura de la masa ovígera y del desarrollo embrionario fue abordado a través de observaciones a campo, microscopía óptica y experiencias en acuario. Mientras que la ecología trófica de *P. maculata* fue descripta mediante observaciones de alimentación *in situ* y estudios de contenido estomacal en dos sitios de muestreos (técnicas directas), complementando con análisis de isótopos estables de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de individuos que habitan zonas costeras y profundas (técnicas indirectas).

El estudio del ciclo gametogénico evidencia que *P. maculata* sería una especie semélpara con un ciclo reproductivo anual. Durante los meses de febrero y marzo se observó una coexistencia de individuos inmaduros con individuos cuya gónada se encuentra en deterioro (post-reproductivos), observándose raramente individuos

maduros. La mayor actividad gametogénica ocurrió entre julio y enero, observándose además un aumento en el número de masas ovígeras en el campo. Los aumentos naturales en el fotoperíodo condicen con el inicio del período de oviposición (julio) así como en la frecuencia de masas ovígeras, con un máximo de puestas encontradas en enero.

El número de masas ovígeras estimadas por individuo fue de cinco puestas anuales con un promedio de 101.842,07 embriones por masa ovígera. El desarrollo embrionario concluye con la eclosión de una larva planctotrófica. Se observó un aumento en la talla de eclosión al aumentar la temperatura del agua, mientras que el tiempo total de desarrollo embrionario disminuyó ante el aumento de la temperatura, resultando exitoso dentro de un rango térmico similar a las fluctuaciones del agua de mar observadas en el sitio de estudio. Según los límites de tolerancia térmica durante el desarrollo embrionario la especie podría ampliar su rango de distribución hacia el sur al menos a lo largo del Golfo San Jorge.

Adicionalmente, el mecanismo de cópula observado en *P. maculata* combina una etapa de fecundación interna con una etapa de transferencia hipodérmica post-copulatoria, con un alto grado de reciprocidad entre individuos, lo que podría representar una estrategia adaptativa de selección sexual.

Los estudios dietarios mediante métodos directos e indirectos, revelaron que *P. maculata* presenta una amplia plasticidad en el uso de los recursos y su dieta en el nuevo hábitat está constituida por una amplia variedad de presas, incluyendo además algas que no han sido previamente descritas para este género.

Los resultados de esta Tesis brindan información novedosa y relevante acerca de la biología reproductiva y ecología trófica de *P. maculata*, que ayudan a explicar la rápida expansión de la misma a lo largo de la costa Argentina.

Reproduction and trophic ecology of *Pleurobranchaea* sp. (Opisthobranchia) in Golfo Nuevo gulf, Patagonia, Argentina.

## ABSTRACT

Since being introduced in 2009, the invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* has spread along the coast of Argentina, expanding from Mar del Plata (Buenos Aires) to Bahía Camarones (Chubut). The main focus of this work is to study the reproductive biology and trophic ecology of *P. maculata* from Golfo Nuevo, Patagonia, which was guided by the following hypothesis: 1- The reproductive biology of *P. maculata* favors its establishment and expansion along Argentinean coast. 2- The trophic ecology of *P. maculata* favors its establishment and expansion along Argentinean coast. Three specific objectives were proposed: 1- To describe the copulatory behavior of *P. maculata* and to study its reproductive maturity and seasonality, relating its reproductive cycle with environmental variables. 2- To describe the egg masses and embryonic development until hatching, to estimate the individual fecundity and to study the effect of photoperiod on *P. maculata* oviposition as well as the effect of temperature on embryonic development. 3- To describe the diet of *P. maculata* and its trophic relationships by means of direct and indirect methods.

The species reproductive biology was studied by means of direct field observations, aquarium experiences, classical histology and microscopy (optical and scanning electron (SEM)) techniques. In addition, to detect gonadal cell apoptosis a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay was performed. The morphology, structures and organization of the egg masses, spawning period and intracapsular embryonic development was described through field observations, optical microscopy and aquarium experiences. Finally, the trophic ecology of *P. maculata* in Golfo Nuevo was described through *in situ* observation of feeding events, stomach content analysis in two sampling sites (direct techniques), and stable isotope analysis of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of individuals that inhabit coastal and deep areas (indirect techniques).

Results suggest that *P. maculata* is a semelparous species with an annual reproductive cycle. During February and March, immature individuals and individuals with deteriorative acini structure (post-reproductive) coexist, while mature individuals were

rarely observed. The highest gametogenic activity was observed from July to January, together with an increase in the number of egg masses in the field was observed, with the higher number registered in January, corresponding to the summer solstice. In addition, egg masses frequency increased with photoperiod (more hours of light). Experimental estimation showed that each individual can spawn at least five egg masses annually. The mean number of eggs / embryos per egg mass was 101,842.07.

Embryos developed inside the egg capsules until hatching as a planktotrophic veliger. Significantly larger embryonic shell length and shorter embryonic developmental times were found at higher seawater temperatures. Only the egg masses exposed to a thermal range similar to the seawater temperature fluctuations observed at the study site completed embryonic development. According to the limits of embryonic thermal tolerance during intracapsular development observed in this Thesis, *P. maculata* may extend their distribution range to the south at least throughout Golfo San Jorge.

Additionally, *P. maculata* showed a combination of internal fertilization followed by a series of hypodermic post-copulatory transfers not previously registered among opisthobranchs. This particular combination of reproductive modalities could represent an adaptive sexual selection strategy.

Dietary studies, using direct and indirect techniques, revealed that *P. maculata* shows great plasticity in the use of food resources in the new habitat, which is constituted by a wide variety of prey, including algae not previously described in the diet of this genus.

This Thesis provides original and relevant information about the reproductive biology and trophic ecology of *P. maculata* that help explaining its rapid expansion along Argentinan coast.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

La subclase Opisthobranchia, pertenecientes a la Clase Gastropoda del Phylum Mollusca, incluye representantes exclusivamente marinos, de cuerpo blando, con una concha reducida o ausente y sin opérculo (Giese y Pearse 1974). Sus miembros son exclusivamente animales hermafroditas que poseen un sistema reproductivo estructural y funcionalmente complejo (Giese y Pearse 1974, Warner 1975). A lo largo de su evolución, estos organismos han desarrollado una diversidad de estructuras para resolver los problemas funcionales que ocurren cuando el mismo individuo presenta ambos sexos (Klussmann-Kolb y Wägele 2001). En consecuencia, existen numerosos estudios anatómicos de los sistemas reproductivos que sirvieron como base taxonómica para dilucidar las relaciones filogenéticas entre los opisthobranquios (García et al. 1994, Willan 1998, Wägele y Willan 2000, Klussmann-Kolb y Wägele 2001, Anthes et al. 2008, Martynov y Schrödl 2009).

Las especies del Superorden Nudipleura han sido descriptos como especies semélparas (Todd y Doyle 1981, Todd 1983, Havenhand y Todd 1989) con ciclos de vidas anuales, como es el caso de *Berthellina citrina* (Pleurobranchidea), o bienales, como *Pleurobranchaea meckelii* (Pleurobranchaeidea) (Cattaneo-Vietti et al. 1993). Sin embargo, también se registran algunas especies iteróparas como es el caso del nudibranquio *Cadlina laevis* (Davies 1993). Mayormente, el desarrollo embrionario de las especies de nudipleuros suele ser corto, finalizando con la eclosión de una larva planctotrófica o lecitotrófica (Gibson 2003). Solamente se conocen tres especies de nudipleuros que presentan desarrollo directo, pertenecientes a la familia Dendrodorididae (Goddard 2005). Durante su corta vida, suelen realizar sucesivos eventos de desove, posiblemente como una manera de maximizar el número de descendencia producida. Esto demanda un alto esfuerzo reproductivo, posiblemente relacionados a los procesos fisiológicos que llevan a una muerte programada (Havenhand y Todd 1989). También podría ser una forma de compensar las altas tasas de mortalidad a las que se encuentran sometidas las larvas de vida libre (Vance 1973).

En los Notaspidea se observan diferencias importantes en la morfogénesis de las larvas en relación a otros opisthobranquios, en las que se incluyen el crecimiento de la concha y su posterior pérdida, un crecimiento atípico del manto y la falta de un opérculo (Goddard 2004, Gibson 2003). En particular, en los Pleurobranchoidae sin concha la pérdida de la

misma ocurre a través del sobrecrecimiento con posterior disolución por el manto durante o poco después de la metamorfosis (Tsubokawa y Okutani 1991, Gibson 2003). El manto comienza a tomar características adultas en una etapa larval temprana (Gibson 2003).

Las especies pertenecientes a la Superfamilia Pleurobranchoidae comparten numerosas características morfológicas, entre ellas, presentan un manto prominente, las conchas son internas y suelen sufrir una reducción o la pérdida completa en los adultos (Willan 1984, Tsubokawa y Okutani 1991, Willan 1998, Gibson 2003). Presentan un velo trapezoidal entre los tentáculos orales por encima de la boca, con ranuras orales longitudinales (Willan 1998). Las especies incluidas en este grupo se caracterizan por presentar un largo pene retráctil dispuesto inmediatamente delante de las branquias en el lado derecho (Willan 1998). Generalmente estos individuos forman parejas de cópula que, mediante una fecundación interna y cruzada, transfieren recíprocamente su esperma y lo almacenan hasta que los huevos están listos para la fecundación (Barnes 1969).

Las puestas en los pleurobranquidos consisten en una masa gelatinosa alargada en forma de tubo, cintas o cilindro, dentro de la cual se disponen un número variable de huevos dentro de cápsulas ovígeras. Las puestas son depositadas sobre sustrato duro, como rocas, algas, conchillas o estructuras artificiales, y luego son abandonadas sin cuidado parental; como contrapartida la masa gelatinosa y las ovicápsulas representan estructuras que protegen a los embriones en desarrollo contra daños mecánicos, infecciones, depredación y estrés osmótico, entre otros (Klussmann-Kolb y Wägele 2001, Przeslawski 2004, Przeslawski y Davis 2007). A su vez, se ha reportado en algunas especies la presencia de una capa nutritiva asociada a la membrana interna de la cápsula, que asegura la energía suficiente para que los embriones terminen el desarrollo intracapsular (*Bathyberthella antarctica*, Pleurobranchidae) (Klussmann-Kolb y Wägele 2001).

El género *Pleurobranchaea* presenta una distribución geográfica cosmopolita, sus ejemplares habitan ambientes submareales, en aguas tropicales o templadas (Willan 1984). Ocupan las zonas poco profundas desde el intermareal hasta los 150 m de profundidad (Muniain et al. 2007). La especie *Pleurobranchaea inconspicua* habita aguas del Golfo Nuevo (Muniain et al. 2007), donde recientemente se ha registrado la presencia en altas densidades de otro opistobranquio perteneciente a dicho género (Farias et al. 2015). Mediante la secuenciación de un gen mitocondrial (CO1) se estableció a la especie invasora como *Pleurobranchaea maculata* (Nudipleura, Pleurobranchida,

Pleurobranchaeidae), proveniente de áreas submareales poco profundas alrededor de Nueva Zelanda (Farias et al. 2016) (Fig. 1). A su vez, la especie ha sido registrada en el sureste de Australia, China y Japón ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)).

Actualmente, numerosas especies marinas atraviesan las barreras biogeográficas naturales con facilidad, debido a una tendencia creciente del comercio y el transporte a través de los océanos y continentes (Hulme 2009, Katsanevakis et al. 2016). De este modo, se ve facilitada la introducción de especies en nuevos hábitats (Schwindt 2008). Las especies invasoras pueden tener un alto impacto en los ecosistemas naturales (Mendez et al. 2015), ya sea afectando los procesos ecosistémicos (Carlton 1999, Grosholz et al. 2000, Schwindt et al. 2001, Hoffmeister et al. 2005), modificando las interacciones ecológicas (Hallegraeff 1998, Torchin et al. 2002) y/o generando variados impactos socio-económicos (Schwindt 2007). Frecuentemente, la introducción de depredadores en los ecosistemas acuáticos produce cambios en la abundancia de los organismos de las comunidades nativas, pudiendo reducir de manera directa la abundancia de un gran número de especies y aumentando de manera indirecta la de otras, ocasionando cambios a múltiples niveles tróficos, como es el caso del cangrejo verde (*Carcinus maenas*) introducido en la costa central de California (Grosholz et al. 2000) y Argentina, por primera vez en la Patagonia (Hidalgo et al. 2005).



Figura 1. Individuo y masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata* en su nuevo hábitat (Golfo Nuevo, Chubut). Fotografía: Andrés Averbuj.

Las especies introducidas que han logrado establecerse con éxito en un nuevo hábitat presentan ciertos rasgos de la historia de vida que favorecen su expansión, ya que las hacen muy eficientes y fuertes competidoras. Entre estos rasgos se destacan: mecanismos reproductivos que promuevan una alta tasa reproductiva (León y Vargas 2009, Beninger et al. 2010, Zhan et al. 2015), que alcance la madurez reproductiva en un corto período tiempo (Johnston et al. 2009, Zhan et al. 2015), un crecimiento inicial rápido, una rápida colonización (León y Vargas 2009), largo período de oviposición (Beninger et al. 2010, Zhan et al. 2015), una alta fecundidad (Johnston et al. 2009, Beninger et al. 2010, Zhan et al. 2015), una rápida dispersión, una alta supervivencia, una fuerte resistencia a condiciones adversas, una alta tolerancia a la heterogeneidad ambiental y un uso eficiente de los recursos del nuevo hábitat, entre otras (León y Vargas 2009). Actualmente, *P. maculata* se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la costa Argentina, extendiéndose desde Mar del Plata (Farias et al. 2015) hasta Bahía camarones (Battini et al. 2019). La amplia distribución de *P. maculata* a lo largo de la costa Argentina, así como la gran abundancia que se observa en adultos y puestas, sugiere que la especie presenta una capacidad invasora exitosa (Battini et al. 2019). A su vez, todas las especies pertenecientes al género *Pleurobranchaea* fueron reportadas como carnívoros voraces (Ottaway 1977), pudiendo consumir una amplia diversidad de especies, lo que podría resultar favorable ya que le permite adaptarse a la nueva oferta de presas del nuevo hábitat. Por ello, la comprensión de la biología reproductiva de *P. maculata* y el estudio de sus nuevos hábitos alimenticios, representa información acerca de su potencial invasivo a lo largo de la costa Argentina y es esencial para comprender las implicancias ecológicas de la especie en su nuevo hábitat (Sakai et al. 2001, Devin y Beisel 2007, Rius et al. 2009).

Adicionalmente, el establecimiento de especies introducidas en nuevos hábitats se ve favorecida por la ausencia de depredadores. En particular los opistobranquios se caracterizan por presentar numerosos mecanismos de defensa, que protegen a los individuos del ataque de otros animales (Thompson 1960, Ros 1976). Entre los mecanismos de defensa descritos para *P. maculata* se destacan las secreciones de ácido sulfúrico de glándulas epiteliales que disminuyen el pH del manto hasta 1-2 (Gillette et al. 1991) y la presencia de tetrodotoxina (TTX), una potente neurotoxina que ataca los canales de sodio inhibiendo la propagación de los potenciales de acción en músculos y células nerviosas (Narahashi 2001). *Pleurobranchaea maculata* sería impalatable y/o

peligrosa para otras especies y hasta el momento se desconocen depredadores para la misma, lo que favorecería su rápida expansión. En particular, ha sido demostrado que *P. maculata* presenta la habilidad de incorporar TTX a través de la dieta (Khor et al. 2014) o bien de incorporarla mediante algún otro factor ambiental (Salvitti et al. 2017). Estudios recientes demuestran que TTX está presente en las poblaciones de *P. maculata* que habitan las costas Argentinas, en particular ha sido detectada en las poblaciones que habitan Mar del Plata y Puerto Madryn (Farias et al. 2019), lo que implica un riesgo más allá del ecológico, con posibles consecuencias sanitarias. Por ello es de fundamental importancia avanzar en el conocimiento de la especie en su nueva región para sentar las bases para futuros estudios de su potencial riesgo sanitario.

La presente Tesis tiene como especie objetivo el opistobranquio *P. maculata*, cuya identificación taxonómica ocurrió luego de la presentación y aceptación del Plan de Tesis propuesto. Debido a la complejidad burocrática que conllevan los cambios de títulos de las tesis en las universidades, el nombre científico de la especie objetivo no fue actualizado en el título de la misma. En esta Tesis se estudia la biología reproductiva y ecología trófica de *Pleurobranchaea maculata* con el fin de clarificar de qué manera y con qué intensidad esta especie se ha insertado en el nuevo ecosistema. A su vez la información acerca de la ecología de la especie es esencial para la elaboración de pautas de manejo efectivas para prevenir, controlar o retardar la propagación de esta especie tóxica.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

A partir de lo expuesto, el objetivo de esta Tesis es estudiar la biología reproductiva y la ecología trófica del opistobranquio *Pleurobranchaea maculata* en Golfo Nuevo, Chubut.

## Objetivos específicos

- ✚ Estudiar el comportamiento y mecanismos reproductivos de *Pleurobranchaea maculata*, así como la estacionalidad y madurez reproductiva y relacionar el ciclo reproductivo con variables ambientales.
  
- ✚ Describir las masas ovígeras y el desarrollo embrionario hasta la eclosión. Estimar la fecundidad individual y evaluar el efecto del fotoperiodo sobre la oviposición de *Pleurobranchaea maculata* así como el efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario.
  
- ✚ Describir la dieta y la trama trófica de *Pleurobranchaea maculata* mediante técnicas directas e indirectas.

Se plantean las siguientes hipótesis y predicciones en relación al objetivo general:

Hipótesis 1: La biología reproductiva de *Pleurobranchaea maculata* favorece su establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina.

Predicción 1: *Pleurobranchaea maculata* presentará un ciclo reproductivo estacional, una rápida madurez reproductiva y varios eventos de desove durante su periodo reproductivo.

Predicción 2: *Pleurobranchaea maculata* presentará una alta fecundidad individual con un corto periodo de desarrollo embrionario intracapsular.

Hipótesis 2: La ecología trófica de *Pleurobranchaea maculata* favorece su establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina.

Predicción 1: La dieta de *Pleurobranchaea maculata* estará constituida por más de una especie de invertebrados marinos.

Predicción 2: *Pleurobranchaea maculata* presentará un uso de recurso alimenticio variable según las características del ambiente en que habite.

# METODOLOGÍA GENERAL

## Área de estudio

Los sitios donde se realizaron los muestreos se encuentran en el Golfo Nuevo, en cercanía a la ciudad de Puerto Madryn, Chubut, Patagonia, Argentina (Fig. 2)

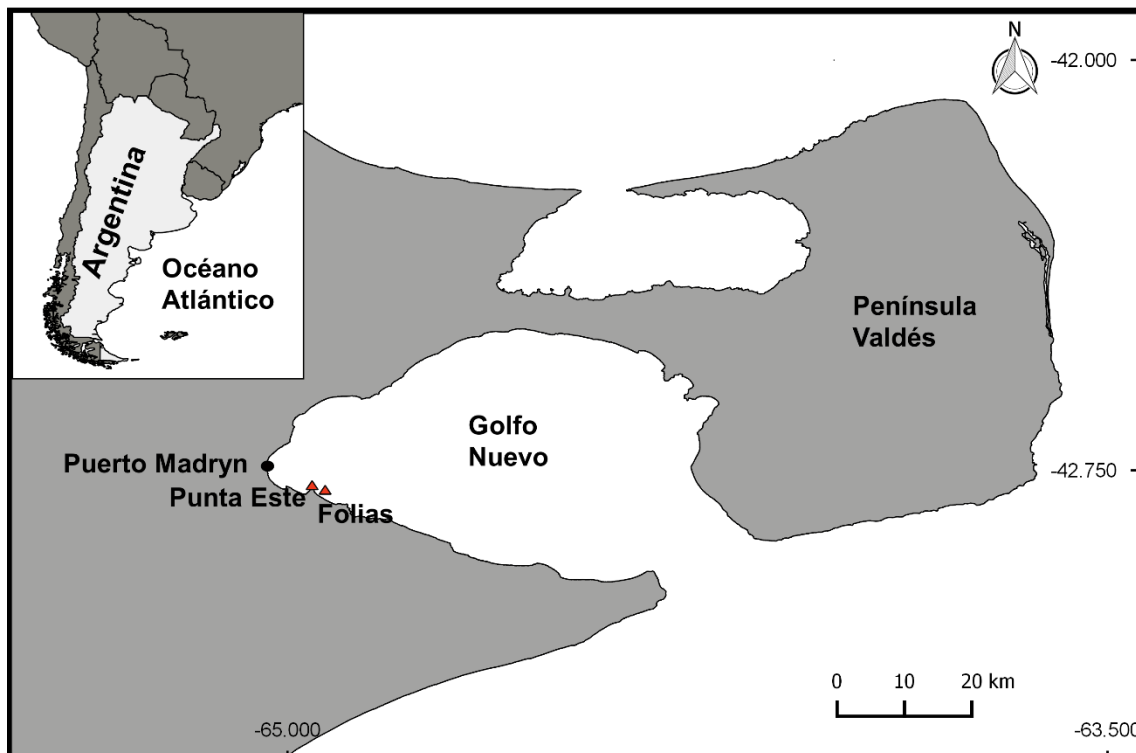


Figura 2. Sitios de muestreo: playa Punta Este y naufragio Foliás (frente a playa Paraná) en el Golfo Nuevo.

La región se caracteriza por presentar un clima frío-templado, escasas precipitaciones (valor medio anual: 235,9 mm) y fuertes vientos que soplan mayoritariamente desde el sector sudoeste y oeste (intensidad media anual de 16,6 km/h) (Coronato et al. 2017). La temperatura media anual, según registros del período 1983-2014, es de 13,6°C; la media mensual máxima es de 20,4°C en enero durante el verano, y la media mínima es de 6,4°C en julio durante el invierno (Coronato et al. 2017).

El Golfo Nuevo presenta una superficie de 2.440 km<sup>2</sup>; su profundidad máxima es de 184 m y presenta una boca de 17km de ancho (Dellatorre et al. 2012). Su profundidad media es de 90 m (Rivas 1990). La salinidad media del agua de mar es de 34‰ (Rivas y

Beier 1990) y la temperatura del agua en su capa superficial oscila entre 9 y 19°C (Dellatorre et al. 2012, SHN 2019), sin embargo se observa una marcada variación según la época del año sufriendo una estratificación marcada en verano (Rivas y Beier 1990). El régimen de mareas dominantes es semidiurno y presenta amplitudes entre 1,83 m y 5,73 m (Dellatorre et al. 2012).

## **Muestreos**

Se realizaron un total 32 muestreos entre octubre de 2015 y abril de 2019 en Punta Este (Fig. 2), una playa que se encuentra a 8 km al sur de la ciudad de Puerto Madryn sobre la costa oeste del Golfo Nuevo (Fig. 3-A, B). En la zona del submareal somero, la playa se caracteriza por presentar un fondo mixto de piedra caliza consolidada con parches de arena y grava (Fig. 3-C y D), albergando una gran riqueza y diversidad de invertebrados (Rechimont et al. 2013). En invierno, toda la zona de muestreo se cubre completamente por la presencia del alga parda invasora *Undaria pinnatifida* que forma bosques submarinos de 1,5 m de altura (Casas et al. 2008) (Fig. 3- E).

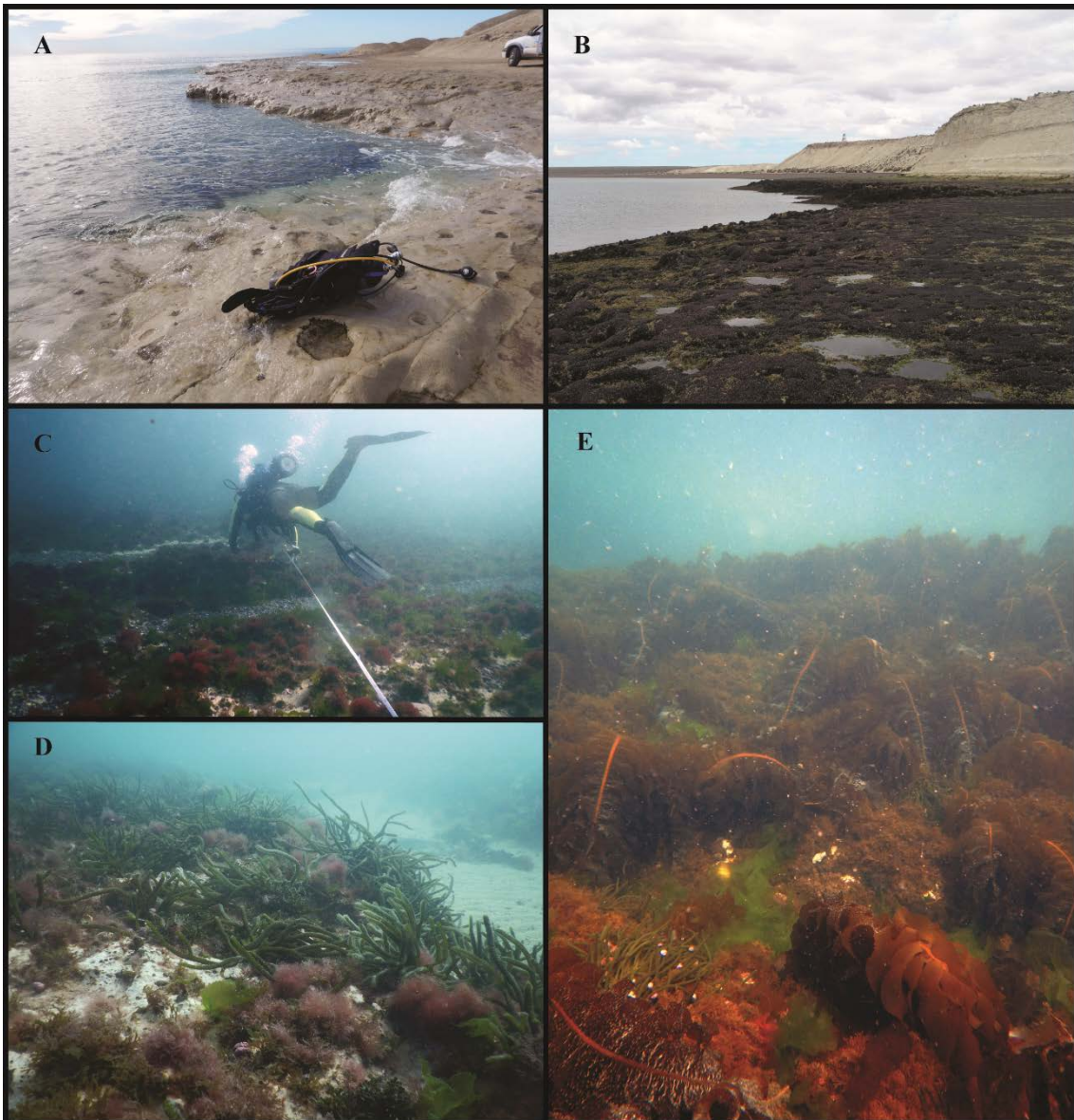


Figura 3. A-B: Playa Punta Este con marea alta (A) y marea baja (B). C: Fondos marinos del sitio playa Punta Este durante un muestreo por transecta. C y D: Zonas de fondo rocoso con parches de arena. E: Fondo marino rocoso cubierto por el alga parda *Undaria pinnatifida*. Fotografías: A-B: María Martha Mendez, C-E: Andrés Averbuj.

Los muestreos se realizaron mediante buceo autónomo desde la costa, a profundidades de entre 5 y 10 metros. Para los estudios reproductivos se realizaron muestreos durante un año (octubre 2015 - septiembre 2016) y estacionalmente durante un segundo año (primavera 2016; verano 2017, otoño 2017 e invierno 2017). Durante los mismos, se recolectaron al azar un total de 279 individuos de todas las tallas encontradas, de los cuales 252 fueron utilizados para el estudio del ciclo gametogénico y 27 fueron utilizados

con fines experimentales; además de 70 masas ovíferas de *Pleurobranchaea maculata* (Fig. 4-A-B). Desde mayo 2018 hasta abril de 2019 los muestreos mensuales se complementaron con la implementación de transectas de 10 metros de largo por 2 de ancho, en las que se contabilizó el número de puestas (Fig. 4-C), realizando 10 réplicas por inmersión (muestreos sistemáticos). En cada capítulo se explica en detalle la metodología utilizada, número de individuos recolectados y la frecuencias de muestreo.

Adicionalmente, se realizó un estudio comparativo de los contenidos estomacales, para el cual se recolectaron un total de 102 individuos de *P. maculata* en dos sitios: el arrecife natural en Punta Este (N=61) y el naufragio Foliás (N=41), que representa un sustrato de origen antrópico. El barco se encuentra ubicado frente a playa Paraná, 13 km al sur de la ciudad de Puerto Madryn y hoy en día sirve de sustrato y refugio de un gran número de especies.

Por otro lado, se realizaron muestreos extraordinarios (no estacionales) en zonas profundas cercanas al sitio Punta Este. A 1,5 km en dirección perpendicular a la costa de Punta Este, la pendiente del fondo marino cae abruptamente llegando a profundidades de hasta 42 m. Debido a la ausencia de algas en zonas profundas, este sitio fue utilizado para comparar los estudios de la dieta de *P. maculata* con presencia y ausencia de algas mediante la técnica de análisis de isótopos estables de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ . Un total de 20 individuos fueron recolectados al azar mediante buceo autónomo en las zonas costeras, mientras que un total de 17 individuos se capturaron a profundidades entre 33 y 39 metros. Para ello, mediante un vehículo de control remoto con cámara en superficie se confirmó la presencia de individuos en el área. Luego, por única vez, los individuos fueron recolectados mediante una pequeña rastra de fondo de uso científico (40 cm de ancho y 20 cm de alto) tirada por una embarcación semirrígida con motor fuera de borda (Fig. 4-D). El muestreo en este sitio se realizó en el punto GPS -64,93 O; -42,78 S, expresado en grados decimales.

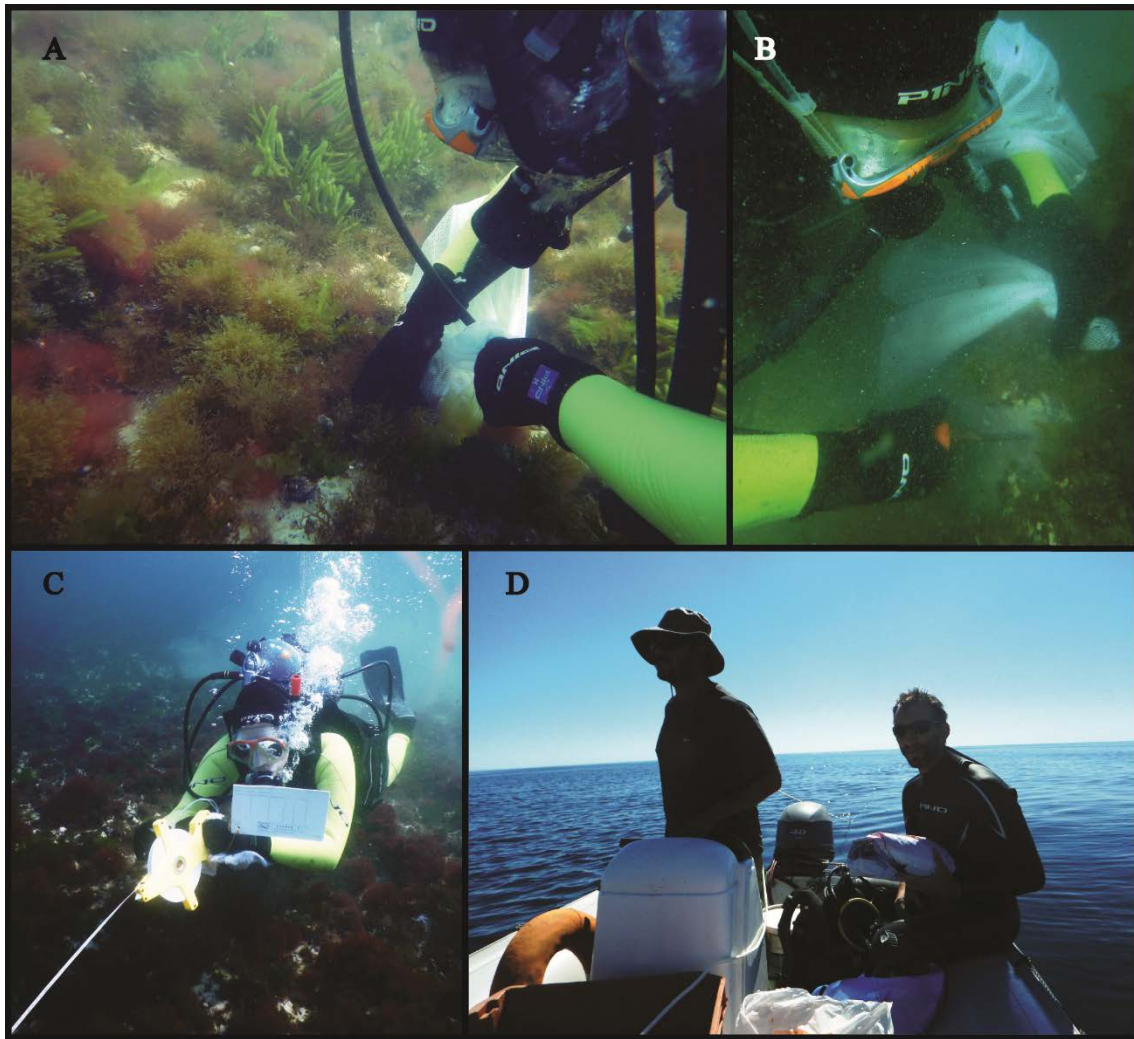


Figura 4. Metodologías de muestreo. A: Recolección manual de individuos de *P. maculata*. B: Muestreo de fondo marino. C: Muestreo mediante transectas. D: Muestreo con rastra de uso científico tirada por embarcación. Fotografías: A-C: Andrés Averbuj, D: Verena Bökenhans.

## Procesamiento de las muestras

Todos los individuos capturados fueron anestesiados con  $MgCl_2$  al 7,5% antes de su procesamiento, o bien mantenidos vivos con fines experimentales en acuarios con agua de mar con aireación constante.

A cada individuo recolectado se le midió el largo total (LT) y el ancho (A) del cuerpo con un calibre digital de 0,1 mm de precisión, en lo posible durante el desplazamiento, momento en el que mantiene su cuerpo prolongado (Fig.5-A). A su vez se registró el peso (P) húmedo, previamente secado brevemente con papel absorbente, con una balanza digital de 0,1 g de precisión. En el caso de las puestas el largo total fue considerado como

el largo extendido de un hilo que sigue toda la longitud de la masa ovígera de un extremo al otro y el ancho fue considerado como el diámetro del cilindro (Fig. 5-B).

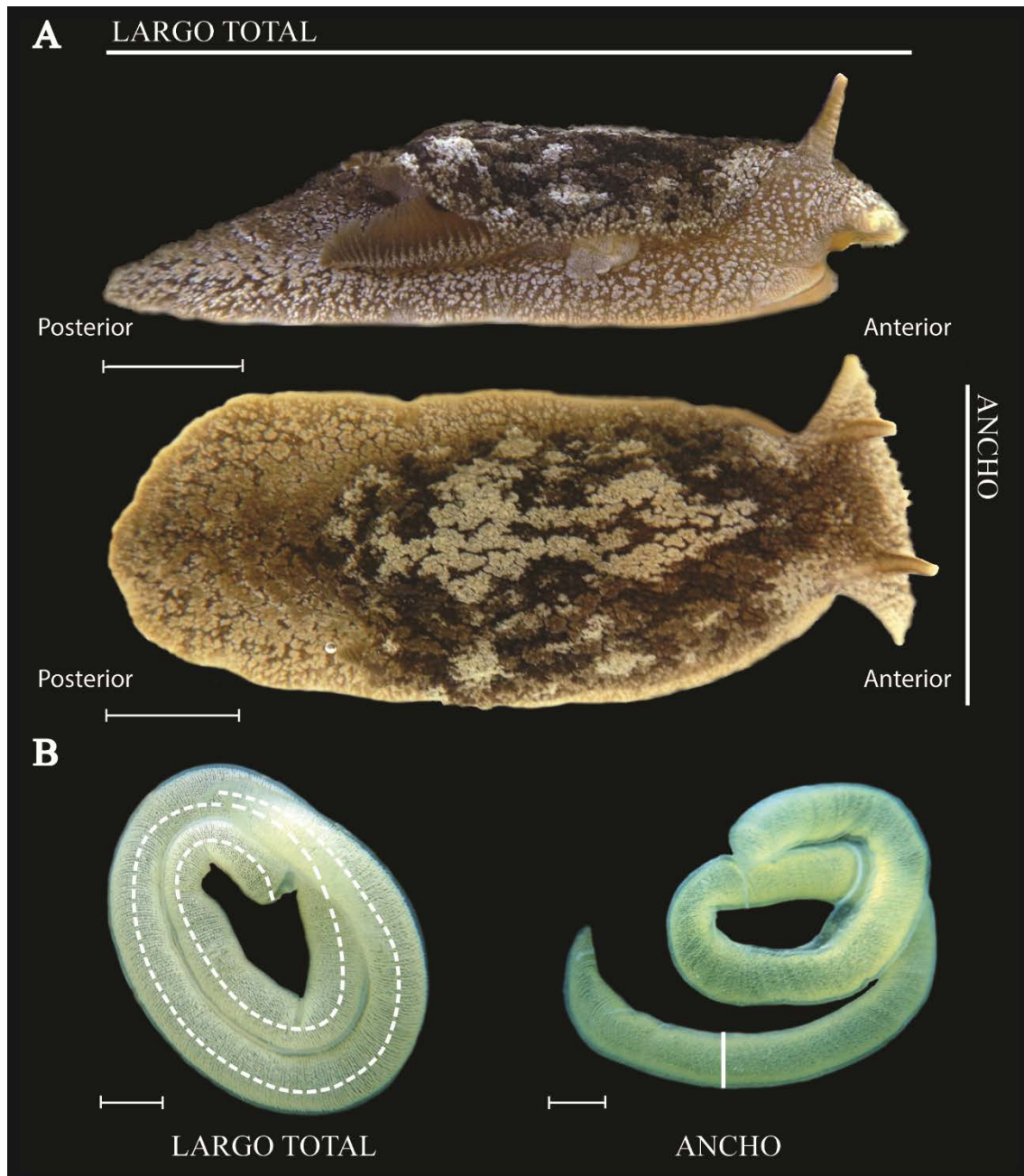


Figura 5. Medidas morfométricas de individuos (A) y masa ovígera (B) de *Pleurobranchaea maculata*. A: Vista del lateral derecho (imagen superior) y vista dorsal de una individuo de *P. maculata*. B: La línea punteada ejemplifica el largo extendido de un hilo que se utiliza para su medición. Escalas: 1cm. Fotografías: Verena Bökenhans.

Aquellos ejemplares recolectados con fines experimentales fueron trasladados a la cámara de temperatura controlada del *Servicio de Acuarios Experimentales* del CCT-CENPAT. Los individuos fueron colocados en jaulas construidas con mallas plásticas de 10 cm de largo, 20 cm de ancho y 25 cm de alto, inmersas en un acuario de vidrio (90 cm x 30 cm x 30 cm) (Fig. 6-A). El agua se mantuvo acondicionada con una salinidad de 34‰, controlada diariamente mediante un refractómetro de mano y ajustada con agua destilada de ser necesario. La temperatura del agua fue mantenida entre 13-14 °C y controlada mediante un termómetro de mercurio flotante. Adicionalmente se controló la concentración de nitratos disueltos mediante un kit- nitrato para acuario y el pH mediante un pH-metro digital y en caso de ser necesario se realizaba un recambio del agua de mar. El acuario estaba provisto con un flujo continuo de agua mediante un sistema cerrado de recirculación. El mismo consistía en una balde de 200 litros, con un biofiltro de partículas flotantes (degradación de productos nitrogenados) y un espumador (extracción de sólidos disueltos) (Fig. 6-B).

Diariamente, los animales se alimentaron con las partes blandas de los bivalvos (*Mytilus edulis* o *Aulacomya atra atra*) y los restos de comida y material fecal fueron extraídos.

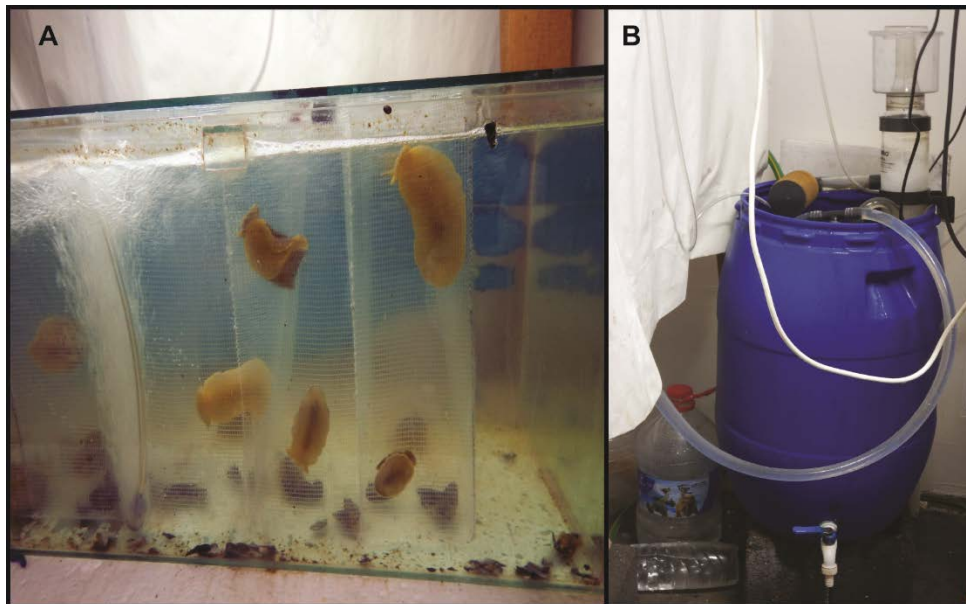


Figura 6. A: Acuario experimental con dos individuos por jaula. B: Sistema de recirculación cerrado. Fotografías: Verena Bökenhans.

Los registros fotográficos obtenidos en el campo mediante buceo autónomo se realizaron con una cámara digital subacuática NIKON “Nikkor” de 16 megapíxeles. En el laboratorio, se utilizó una cámara digital Canon “PowerShot G16” de 12.1 megapíxeles incorporada a la lupa estereoscópica Zeiss, mientras que en el microscopio óptico Zeiss, se trabajó con una cámara digital ZEISS AxioCamERc5s asociada al software ZEN 2012, mediante el cual se realizaron las mediciones correspondientes.

### **Preparaciones histológicas para microscopía óptica**

Las piezas de los tejidos blandos (principalmente gónadas) se fijaron en solución acuosa de Bouin por 12 horas. Posteriormente, se realizaron dos lavados con alcohol 70°, donde fueron conservadas hasta su procesamiento histológico.

Con el fin de incluir las piezas de tejido en parafina para realizar los cortes histológicos, cada pieza se deshidrató progresivamente en alcohol etílico de gradaciones crecientes, donde quedaron sumergidas durante tiempos variables. La primera inmersión se realizó en etanol 80°, donde permanecieron una hora; luego se realizaron dos inmersiones sucesivas en etanol 96° de una hora cada uno, seguido por dos inmersiones en etanol 100° de 30 minutos cada uno. Finalmente se realizó la aclaración mediante dos inmersiones en Xilol durante 30 minutos.

Las muestras se incluyeron en parafina líquida conservada en estufa a 55°C. Se realizaron tres cambios de parafina donde las piezas permanecieron durante 30 minutos (total 90 minutos). Durante la realización de los tacos, las piezas se orientaron de manera de poder obtener cortes transversales de las gónadas. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo digital Leica que se montaron en portaobjetos para su posterior coloración.

Se utilizó la técnica de coloración hematoxilina-eosina. Para ello se realizó un desparafinado con Xilol por 3 minutos seguido por un lavado con Etanol 96°. Las muestras hidratadas mediante lavados de un minuto con alcohol etílico de gradaciones decrecientes (70° y 50°) y finalmente agua destilada. Para la coloración, las muestras fueron sumergidas progresivamente en: Hematoxilina de Gill durante 1 minuto, lavado con agua destilada y eosina alcohólica (0.25%) durante 3 minutos. Por último, se realizó

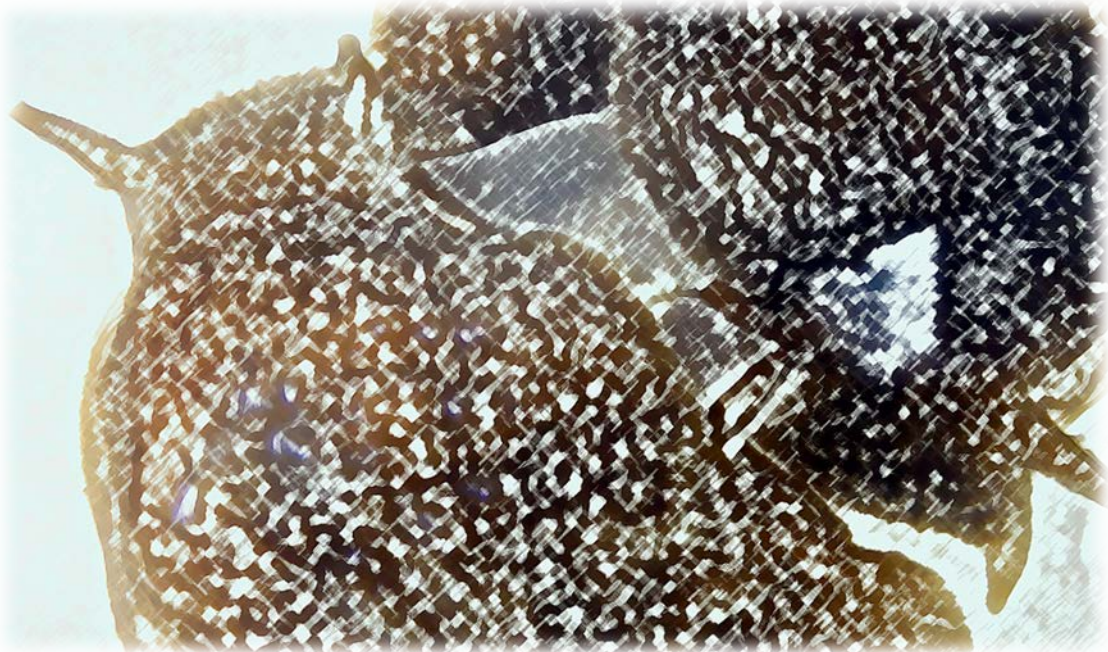
una deshidratación y aclaramiento rápido y los cubreobjetos fueron pegados con bálsamo natural. Las coloraciones fueron realizadas por el *Servicio Centralizado de Histología* del CCT-CENPAT.

### **Preparaciones histológicas para microscopia electrónica de barrido (MEB)**

Pequeñas porciones de tejido blando fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% durante 4 horas, en heladera, y luego se realizaron dos lavados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 por 24 hs. Posteriormente, se realizó una deshidratación progresiva, de todas las piezas, en alcohol 30°, 50°, 70°, 80°, 90° con tres cambios cada 10 minutos y en alcohol 96° y 100° con tres cambios cada 15 minutos. El secado se realizó mediante la inmersión de las piezas en Hexametildicilazane durante 10 minutos, luego de las cuales fueron montadas y en caso de ser necesario se realizó la metalización con una lámina de oro-platino.

Todas las observaciones se realizaron en el Microscopio electrónico de barrido (MEB) de la empresa ALUAR S.A., Puerto Madryn (JEOL JSM-6460LV).

**CAPÍTULO I:  
REPRODUCCIÓN  
Y  
CICLO GAMETOGENICO**



## Introducción

La Subclase Opisthobranchia está representada principalmente por especies hermafroditas simultáneas con fecundación interna (Giese y Pearse 1974). Los opisthobranquios muestran una increíble variedad de comportamientos reproductivos complejos y elaborados (Karlsson y Haase 2002). La transferencia espermática puede implicar parejas o cadenas de cópula (Leonard y Lukowiak 1991, Pennings 1991, Chi-Hoon et al. 2014) y puede ocurrir de manera unilateral (Anthes y Michiels 2007, Anthes et al. 2008), unilateral recíproca, mediante la alternancia de roles sexuales (Leonard y Lukowiak 1991) o bien simultánea (Rutowski 1983, Anthes et al. 2008). A su vez se han descrito variados mecanismos de transferencia espermática desde la alineación de los gonoporos de modo que el pene de un animal pueda depositar esperma libre en la vagina del otro (Giese y Pearse 1974, Longley y Longley 1984, Anthes y Michiels 2007) hasta mecanismos más complejos tales como inyecciones hipodérmicas, donde el esperma es inyectando directamente en el cuerpo de la pareja de cópula mediante espículas (Rivest 1984, Trowbridge 1995, Jensen 1999, Angeloni 2003, Smolensky et al. 2009), o bien a través de la impregnación epidérmica, mediante la adhesión de espermátóforos al manto del compañero (Karlsson y Haase 2002).

La complejidad y variabilidad de los sistemas reproductivos presentan un correlato con el amplio espectro de comportamientos reproductivos (Giese y Pearse 1974, Wägele y Willan 2000, Klussmann-Kolb y Wägele 2001, Anthes et al. 2008). Por lo general, el sistema reproductivo de los opisthobranquios puede diferir en cuanto a la disposición, presencia o ausencia de sus órganos internos (ampulla, próstata, bursa copulatrix, receptáculo seminal, complejo glandular femenino), así como en la ubicación de la apertura femenina y el pene (Wägele y Willan 2000, Klussmann-Kolb y Wägele 2001). En algunas especies, el pene y/o la apertura femenina se encuentran recubiertos por una protuberancia con forma cavernosa, definida como saco genital (Tsubokawa et al. 1992, García et al. 1994). Los penes pueden presentar espinas que permiten el anclaje en la vagina y/o un estilete cuticular accesorio, o bien carecer de ambas estructuras (Gascoigne 1974, Gosliner 1985, Angeloni 2003, Anthes y Michiels 2007, Muniain et al. 2007, Alvim et al. 2014, Farias et al. 2015). Adicionalmente, la gónada puede encontrarse de manera aislada o estrechamente asociada a la glándula digestiva (Giese y Pearse 1974, Medina et al. 1986, Wägele y Willan 2000). A su vez, la organización interna de las gónadas es muy variada. Las gametas femeninas y masculinas pueden desarrollarse en acinos separados

(Thompson 1966, Rivest 1984, Medina y García 1987) o bien dentro del mismo compartimiento (Eckelbarger y Blades-Eckelbarger 1989, Chi-Hoon et al. 2011), donde pueden ocupar lugares espacialmente opuestos o bien que un tipo de gameta se localice de manera periférica y la otra ocupe el centro del acino.

El ciclo gametogénico de los opistobranquios puede ser dividido en estadios diferenciables, brindando información importante acerca de la dinámica reproductiva de una población. El pasaje de una gónada inmadura juvenil hacia una gónada madura de adulto (con presencia de gametas funcionales) indicaría el momento en el cual los individuos podrían comenzar a reproducirse. Adicionalmente, el ciclo gametogénico puede ser indicativo del tipo de ciclo de vida del organismo en cuestión, pudiendo repetirse de manera anual, semianual o continua. Los opistobranquios del Superorden Nudipleura han sido ampliamente descritos como especies semélparas, en función a cambios observados en la densidad de las poblacionales (Todd 1979, Todd y Doyle 1981, Todd 1983, Havenhand y Todd 1988, Cattaneo-Vietti et al. 1993); sin embargo, sus ciclos gametogénicos han sido raramente estudiados. En particular, las especies semélparas carecen de un estadio de reposo y/o fase de recuperación post-evacuatoria, y mueren luego de un único período reproductivo (Lüsis 1961, Parivar 1978).

Nada se conoce acerca de los mecanismos que subyacen la muerte en las especies semélparas de Nudipleura, sin embargo, podrían estar producida por una cadena de eventos bioquímicos que finalmente causa su muerte (Skulachev y Skulachev 1999). Estos procesos pueden promover una fuerte estimulación de la apoptosis o muerte celular programada en uno o varios tejidos (Skulachev y Skulachev 1999). Los procesos apoptóticos suelen caracterizarse por numerosos cambios en la morfología celular, los cuales son acompañados por cambios bioquímicos tales como la fragmentación del ADN cromosómico (Romero et al. 2015). Un método muy utilizado para la detección de la apoptosis es la técnica de TUNEL (del inglés *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*), la cual detecta la fragmentación de ADN nuclear (Hasegawa et al. 1997). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios relacionados a los procesos apoptóticos durante la gametogénesis (Billig et al. 1996, Hsueh et al. 1996, Martinčić et al. 2001, Yamamoto et al. 2011, Ma et al. 2017, Liang et al. 2019). Dichos trabajos se han focalizado principalmente en especies de vertebrados (Billig et al. 1996, Hsueh et al. 1996, Martinčić et al. 2001, Yamamoto et al. 2011) y más recientemente en el molusco

bivalvo *Chlamys farreri* (Ma et al. 2017, Liang et al. 2019), sin embargo, no hay información disponible para especies de opistobranquios.

Numerosos estudios se han centrado en las descripciones anatómicas del sistema reproductivo de las especies pertenecientes a la familia Pleurobranchaeidea como base taxonómica para dilucidar las relaciones filogenéticas entre los opistobranquios (García et al. 1994, Willan 1998, Klussmann-Kolb y Wägele 2001, Anthes et al. 2008, Martynov y Schrödl 2009). Sin embargo, hay una llamativa carencia de información en relación a sus ciclos de vida y/o modalidades reproductivas. Por ello, con el fin de lograr un entendimiento más robusto de la biología reproductiva de *Pleurobranchaea maculata*, en este capítulo se realizó una descripción detallada del comportamiento de cópula de la especie y se estudió mediante técnicas histológicas su estructura interna de la gónada, ciclo gametogénico y madurez reproductiva de modo de conocer su ciclo de vida.

## **Materiales y métodos**

### **1. Evento de cópula**

Un total de once eventos de cópula fueron observados en acuario. Seis ejemplares de *Pleurobranchaea maculata* fueron mantenidos por dos semanas en jaulas individuales con salinidad de 34‰, 13-14°C y alimentados regularmente, según descrito en Metodología General. Luego de este período de aclimatación para evitar cambios compartamentales por motivos de estrés, los ejemplares fueron distribuidos de a pares en recipientes rectangulares plásticos de 20 x 30 cm, para describir el comportamiento durante los eventos de cópula, luego de los cuales volvieron a sus ubicaciones individuales. Para evitar eventos de canibalismo, los individuos fueron alimentados de manera adicional dos horas antes de iniciar el ensayo. Se cronometró la duración de las distintas fases observadas durante el evento de cópula y se calculó el promedio y su desvío estándar ( $X \pm DS$ ). Los encuentros fueron filmados con una cámara digital NIKON “Nikkor” de 16 megapíxeles y posteriormente descriptos.

## **2. Estructura gonadal**

A partir de cortes histológicos se realizó una descripción de la estructura gonadal de *P. maculata* y se clasificaron los diferentes estadios de células gametogénicas presentes. Complementariamente, se observó en el microscopio electrónico de barrido (MEB) (ver Metodología General) la estructura interna de la gónada.

## **3. Madurez reproductiva y ciclo gametogénico**

Quince ejemplares de *P. maculata* fueron recolectados mensualmente durante un año (octubre 2015 - septiembre 2016) y estacionalmente durante un segundo año (primavera 2016; verano 2017, otoño 2017 e invierno 2017). El largo total, ancho y peso de todos los individuos fueron registrados y se calculó su promedio y desvío estándar (ver Metodología General). Una vez anestesiados, la gónada fue extraída mediante disección, para estudiarla mediante técnicas histológicas, según fue descrito en Metodología General.

### Madurez reproductiva

El criterio con el cual los individuos fueron considerados dentro del estadio de madurez reproductiva se estableció según los tipos de células gametogénicas presentes en sus acinos. Los acinos espermatoogénicos y oogénicos fueron clasificados de manera independiente. La presencia de espermatozoides en el lumen acinar fue considerado el criterio que marca el comienzo de la madurez reproductiva de los individuos según sus acinos espermatoogénicos. La presencia de oocitos vitelogénicos fue considerado el criterio que marca el comienzo de la madurez reproductiva de los individuos según sus acinos oogénicos.

### Ciclo gametogénico

Para el estudio del ciclo gametogénico solamente fueron considerados aquellos individuos maduros que presentaran las células germinales de la serie espermatoogénica de forma ordenada en sus acinos, excluyendo individuos inmaduros, post-reproductivos

(ver Resultados- *4. Deterioro de los acinos*) y con acinos espermatogénicos de aspecto desorganizado (ver Resultados- *Procesos de desorganización de los acinos*). A cada individuo maduro se le asignó un porcentaje de cobertura gonadal de cada tipo de células germinales presentes en los acinos, donde fueron considerados para el ciclo espermatogénico tres estadios (Proliferación, Crecimiento y Evacuación; ver Resultados- *Ciclo gametogénico-Tabla 1*) y cinco para el ciclo oogénico (Proliferación, Previtelogénesis, Crecimiento, Pre-evacuación Y Evacuación; ver Resultados- *Ciclo gametogénico-Tabla 1*). El porcentaje mensual se calculó como el promedio de los porcentajes individuales.

Adicionalmente se realizaron histogramas de tallas oocitarias mensual y estacional. Para ello, en cada oocito en los que se visualizó el núcleo y nucléolo se midió y calculó el promedio del diámetro máximo y su perpendicular. La medición se realizó sobre 30 oocitos por individuo, con el software ZEN 2012 asociado al microscopio óptico. Las variaciones estacionales de las tallas oocitarias fueron comparadas con las obtenidas durante el segundo año de muestreo (estacionales).

#### Desorganización en los acinos

Una parte de los acinos espermatogénicos presentaron algún grado de desorganización espacial en relación a la disposición normal de sus estadios celulares. Para estudiar dicho fenómeno, se calculó la proporción de individuos que presentaron algún grado de desorganización espacial de sus estadios celulares. A su vez, a cada individuo se le asignó un porcentaje de cobertura gonadal con desorganización, donde fueron considerados de manera independiente los acinos espermatogénicos y oogénicos; además se calculó el porcentaje mensual como el promedio de los porcentajes individuales.

#### **4. Deterioro de los acinos**

La presencia de cuerpos amarillos a lo largo de la membrana basal de los acinos gametogénicos y un engrosamiento de la misma fue el criterio considerado para incluir los individuos dentro del estadio post-reproductivo. Fueron clasificados de manera independiente los acinos espermatogénicos y oogénicos. Mediante una prueba exacta de

Fisher, se evaluó si los signos de deterioro de los acinos espermatoogénicos se encuentran relacionados con la desorganización observada en sus acinos.

### Apoptosis en la gónada durante el ciclo de vida

A partir del análisis de los cortes histológicos se eligieron diez gónadas de distintos momentos del año representando distintos estadios del ciclo gametogénico y post-reproductivos, para evaluar la presencia de apoptosis mediante la técnica inmunohistoquímica del TUNEL. Esta técnica permite visualizar por medio de tinción nuclear aquellas células que presentan daños en el ADN características de la apoptosis (Gavrieli et al. 1992). Las señales positivas de células apoptóticas se visualizan mediante la coloración marrón oscura de los núcleos celulares, revelando signos de muerte celular programada (apoptosis). Para ello, a partir de los tacos (ver *Microscopía Óptica- Metodología General*), se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo digital Leica que se montaron en portaobjetos con carga electrostática positiva para su posterior tinción. Las tinciones fueron realizadas utilizando el kit comercial ApopTag® S701 (Chemicon), en el Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal en el Instituto de Biología y Medicina Experimental de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

## **5. Ciclo de vida anual**

Las frecuencias mensuales de individuos inmaduros, maduros y post-reproductivos, así como sus pesos promedios ( $X \pm DS$ ), se calcularon a lo largo de un año, considerando de manera independiente los acinos espermatoogénicos y oogénicos.

## **Resultados**

### **1. Evento de cópula**

Durante los eventos de cópula (N = 11) observados se identificó una secuencia en los comportamientos reproductivos. En todos los casos se observó un comportamiento pre-copulatorio, durante el cual un individuo siguió activamente el rastro de la pareja de

cópula, mostrando el lado derecho del manto elevado y presentando levemente extendido el pene y el saco genital.

En cuatro de los once casos observados, el contacto corporal entre individuos no desencadenó el apareamiento. En estos casos, los individuos rastreados no extendieron el pene y saco genital ante el contacto, sin posicionarse de manera antero-posterior junto a su compañero, de modo que sus lados derechos del cuerpo no se acercaron y los individuos se alejaron. Muchas veces, diferentes partes del cuerpo de los individuos entraron en contacto al evitar posicionarse de manera antero-posterior, sin embargo, no se observó ningún tipo de agresividad.

En la mayoría de los casos, se observó que los individuos comenzaron a orientarse de modo de aproximar los lados derechos de sus cuerpos, luego del primer contacto entre individuos. Durante el posicionamiento los individuos mantuvieron el tentáculo oral derecho en contacto con el cuerpo de la pareja de cópula, hasta que los sacos genitales entraron en contacto. El tiempo promedio desde el primer contacto corporal hasta que los sacos entran en contacto fue de  $25,30 \pm 17,02$  segundos ( $X \pm DS$ ) y varió levemente acorde la posición inicial del encuentro ( $N=7$ ).

Ante el contacto entre sacos genitales, se observó la inserción rápida y simultánea de los penes en la vagina de la pareja de cópula (Fig. 7-A). Los velos orales se mantuvieron en contacto con la parte posterior del pie de la pareja de cópula, generando un movimiento circular continuo, girando siempre en sentido horario. La inserción de los penes se prolongó en promedio por  $36,0 \pm 7,98$  segundos ( $N=7$ ). En uno de los casos observados la inserción de los penes ocurrió de manera unilateral, mientras que el pene del otro individuo no fue introducido en la vagina de la pareja. Sin embargo, este pene se mantuvo extendido y pudo observarse la evacuación de un fluido blanco de aspecto líquido que fue liberado al agua de manera casi continua en dos pulsos.

Luego de la inserción de los penes, los mismos fueron extraídos de la vagina e inmediatamente se prolongaron realizando contactos repetitivos con el extremo del mismo sobre la pareja de cópula (Fig. 7-B). Esta acción se observó mayoritariamente sobre el manto y cerca del saco genital de la pareja. Sin embargo, la longitud del pene posibilita alcanzar cualquier zona del cuerpo, observándose también en la región cefálica, en el pie e incluso del lado izquierdo del cuerpo de la pareja de cópula. Durante esta acción, los individuos mantienen el movimiento circular con los velos orales en contacto

con el cuerpo del otro individuo por un tiempo promedio de  $43,86 \pm 28,08$  seg (N=7). Durante este período se observó la evacuación de una secreción densa de color blanco que se eliminó en pulsos y que fue depositado en forma de gotas esféricas sobre el cuerpo de la pareja de cópula.

La cópula finalizó generalmente cuando uno de los individuos muerde al otro, en alguna parte del cuerpo, mientras sus penes aún se encuentran extendidos. El individuo mordido escapó mediante movimientos natatorios. En dos casos observados la cópula finalizó sin agresión.

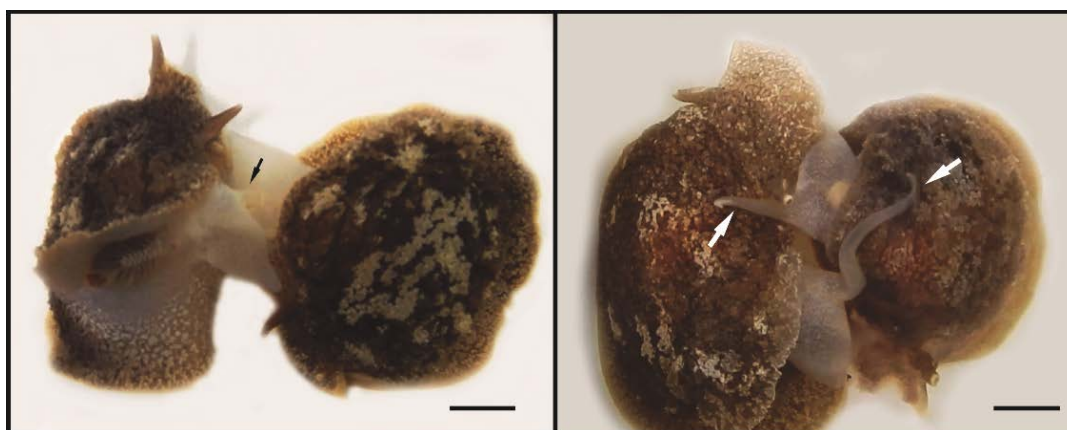


Figura 7. Comportamiento reproductivo de *Pleurobranchaea maculata*. A: Pareja de cópula con los sacos genitales extendidos y en contacto durante la inserción simultánea de los penes (fecundación interna). Flecha negra señala el pene de un individuo introducido en la vagina de la pareja de cópula. B: Pareja de cópula con los penes extendidos sobre el manto del compañero (flechas blancas). Escalas: 1cm. Fotografías: Verena Bökenhans.

## 2. Estructura gonadal

La gónada está compuesta por acinos, que se encuentran delimitados por una membrana basal (Fig. 8-A, B), entre los cuales aparece tejido conectivo. Los oocitos y espermatozoides se desarrollan en acinos separados. Los acinos espermatogénicos se encuentran principalmente en el centro de la gónada y presentan un mayor tamaño que los acinos oogénicos (Fig. 8-A, B). Presentan forma de gota o corazón en corte longitudinal, con un extremo redondeado que se alarga hacia el centro de la gónada. En sus extremos alargados se abren en pequeñas divisiones que conectan con el ducto

hermafrodita (Fig. 8-C, D), las cuales pueden estar vacíos o llenos de espermatozoides maduros (Fig. 8-C, D). Las células espermáticas, en todos los diferentes estadios de desarrollo, se agrupan en forma de racimos, unidos a la membrana basal mediante una célula de gran tamaño (célula de Sertoli). Las células de Sertoli presentan un núcleo grande de aspecto granuloso. Se encuentran ancladas en la membrana basal de los acinos espermatogénicos y producen extensiones citoplasmáticas a la luz acinar a las que se adhieren los distintos grupos celulares. Conforme se desarrollan, las colas de los espermatozoides maduros se orientan hacia el lumen (Fig. 8-E). Los acinos oogénicos se ubican mayoritariamente de manera periférica (Fig. 8-A, B). En un corte transversal, presentan una forma circular y no se observaron uniones directas con el ducto hermafrodita, sin embargo en algunas ocasiones se observó la intrusión de oocitos en acinos espermatogénicos (Fig. 8-F). Los acinos oogénicos presentan diferentes estadios celulares durante la ovogénesis. Los estadios más tempranos de desarrollo se observan unidos a la membrana basal, mientras que los oocitos maduros suelen ocupar el lumen del acino (Fig. 8-E, F), manteniéndose unidas a la membrana basal mediante un pedúnculo.

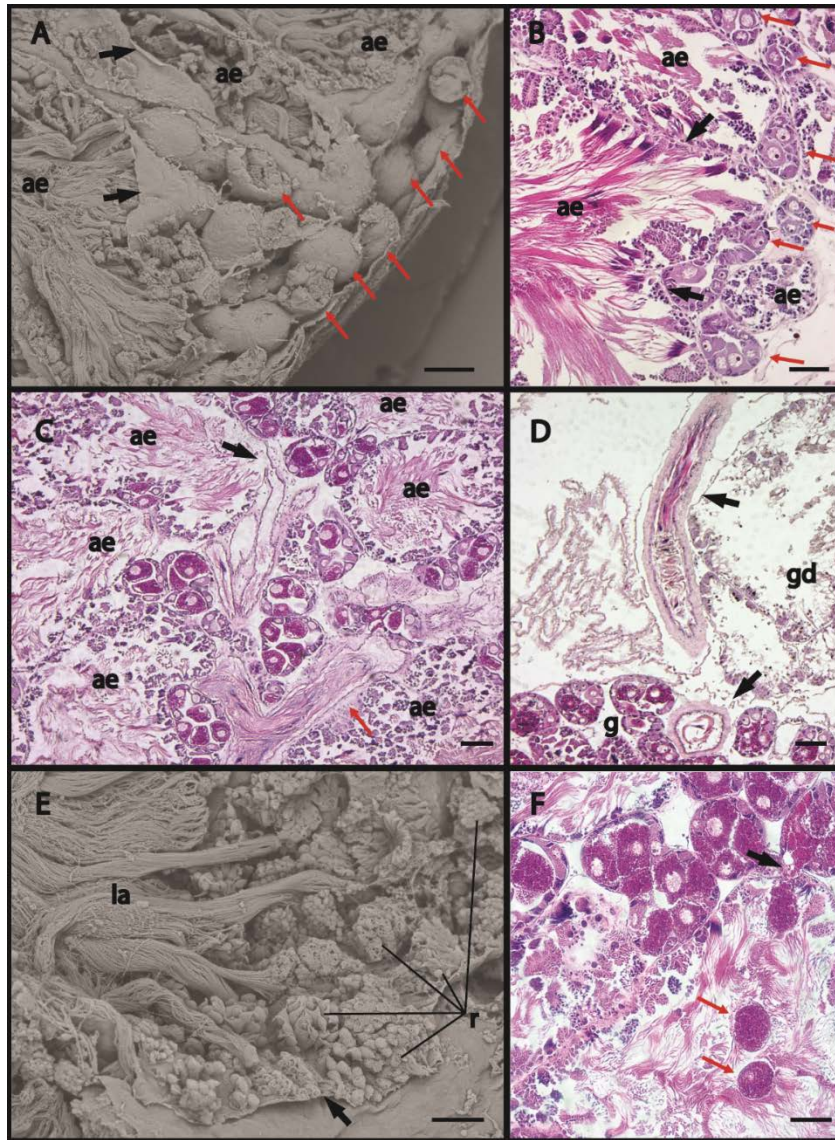


Figura 8. Estructura gonadal de *Pleurobranchaea maculata*. A, B, D, F: Fotografía de microscopía óptica de cortes histológicos de la gónada. C, E: Fotografía de microscopía electrónica de barrido (MEB). A: Fotografía MEB: Estructura de la gónada. Acinos espermatogénicos de gran tamaño y forma alargada. Acinos oogénicos esféricos con distribución mayoritariamente periférica (flechas rojas), delimitados por una membrana basal (flecha negra). B: Estructura de la gónada. Acinos espermatogénicos de gran tamaño y forma alargada, delimitados por una membrana basal (flecha negra). Acinos oogénicos redondos con distribución mayoritariamente periférica (flechas rojas). C: Conexión del acino espermatogénico con las pequeñas divisiones del ducto hermafrodita (flecha negra). Ducto con espermatozoides maduros (flecha roja). D: Ducto hermafrodita ubicado entre la glándula digestiva y la gónada lleno de espermatozoides maduros (flecha). E: Fotografía MEB: Células espermáticas en diferentes estadios de desarrollo agrupadas en racimos asociados a la membrana basal (flecha negra). Colas de espermatozoides orientadas hacia el lumen. F: Zona de intrusión de oocitos a acinos espermatogénicos (flecha negra) y oocitos en acinos espermatogénicos (flecha rojas). Abreviaciones: ae: acinos espermatogénicos, gd: glándula digestiva, g: gónada, la: lumen acinar, r: racimos celulares de diferentes estadios de desarrollo espermatogénicos. Escalas: 100  $\mu$ m. Fotografías: Verena Bökenhans.

### *Estadios celulares en acinos espermatoogénicos*

Las espermatogonias se caracterizan por poseer un núcleo grande, condensado y escaso citoplasma. En los cortes histológicos se observan teñidas en su totalidad de color violeta, por su afinidad a la hematoxilina (acidófilo). (Fig. 9-A). El espermatocito I muestra un cambio en las características del núcleo, debido a que la cromatina se encuentra poco condensada. Los núcleos se observan de aspecto granuloso (Fig. 9-A). Un aumento en el citoplasma y en el tamaño de los núcleos, son característicos en los espermatocitos II (Fig. 9-A). En los cortes histológicos el citoplasma se tiñe de color rosado por su afinidad a la eosina (basófilo). Las espermátidas presentan los núcleos condensados y se alargan progresivamente. El citoplasma se reduce y migra paulatinamente hacia la zona distal de la célula elongándose (Fig. 9-A). Los espermatozoides de aspecto alargado, presentan una cabeza espiralada (zona nuclear-acidófila) y una larga cola (basófilo) (Fig. 9-B, E). Se mantienen unidos mediante las cabezas a una célula de Sertoli, con sus colas orientadas hacia el lumen (Fig. 9-B, E).

### *Estadios celulares en acinos oogénicos*

Las oogonias se caracterizan por poseer un núcleo condensado con un nucléolo distinguible y escaso citoplasma. En los cortes histológicos se observan teñidas de color violeta (acidófilo) y el nucleolo se tiñe homogéneamente de violeta oscuro (Fig. 9-C, D). Los oocitos previtelogénicos presentan un núcleo menos condensado y de mayor tamaño, donde se distingue fácilmente el nucléolo (tinción rosa intenso-basófilo) (Fig. 9-D). El crecimiento del oocito es acompañado con la acumulación de vitelo (vitelogénesis). El mismo se observa con una coloración violeta claro hasta tamaños de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , mientras que en los oocitos maduros ( $< 80 \mu\text{m}$ ) presenta un aspecto granular de coloración rosa intenso (Fig. 9-C, D, F).

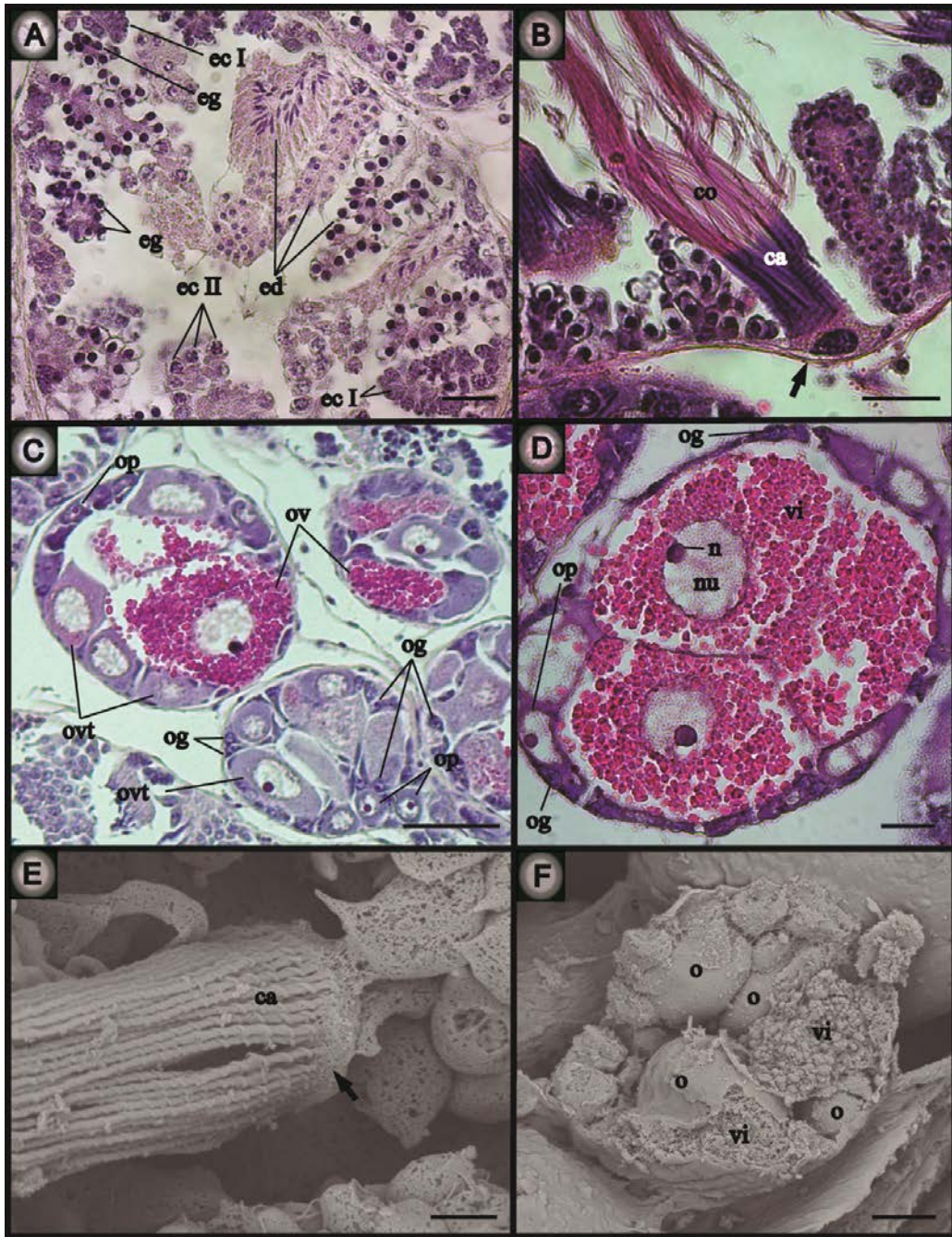


Figura 9. Estadios gametogénicos. A, B, C, D: Corte histológico. E, F: Fotografía de microscopía electrónica de barrido (MEB). A-B: Estadios espermatogénicos. A: Estadios de desarrollo temprano. B: Detalle de espermatozoides unidos mediante las cabezas a una célula de Sertoli (flecha). C-D: Estadios oogénicos. D: Oocitos maduros en el lumen del acino. Detalle de núcleo, nucléolo y vitelo granular. E: Fotografía MEB: Detalle de espermatozoides unidos mediante las cabezas a una célula Sertoli (flecha). F: Fotografía MEB: Acino oogénico con distintos estadios de desarrollo. Abreviaciones: ca: cabeza, co: cola, ec I: espermatocono I, ec II: espermatocono II, ed: espermátidas, eg: espermatogonia, n: nucléolo, nu: núcleo, o: oocito, og: oogonia, op: oocito previtelogénico, ov: oocito vitelogénico, ovt: oocito vitelogénica temprana, vi: vitelo. Escalas: A, B, D, F: 20  $\mu$ m; C: 50  $\mu$ m; E: 5  $\mu$ m. Fotografías: Verena Bökenhans.

### 3. Madurez reproductiva y ciclo gametogénico

Los individuos de *Pleurobranchaea maculata* capturados (N= 252) presentaron un largo total promedio de  $59,52 \pm 13,19$  mm ( $X \pm DS$ ), un ancho promedio de  $28,85 \pm 7,21$  mm y un peso promedio  $15,63 \pm 6,38$  g. El rango registrado para el largo total y ancho máximo varió entre 22,56 y 96,1 mm y de 9,72 a 56,57 mm, respectivamente. El peso mínimo registrado correspondió a un individuo recolectado en marzo (1,1 g), mientras que el peso máximo correspondiente a un individuo recolectado en noviembre (33,8 g).

#### Madurez reproductiva

Las células germinales se diferencian en espermatogonias y oogonias de manera asincrónica. Primero se observa la formación de acinos espermatogénicos en los que proliferan las espermatogonias (Fig. 10-A). A medida que se diferencian los diferentes estadios celulares de la espermatogénesis, los acinos aumentan su tamaño. La madurez reproductiva al considerar los acinos espermatogénicos se caracteriza por la presencia de espermatozoides en el lumen acinar (Fig. 10-A). La formación de los primeros acinos oogénicos comienza cuando los acinos espermatogénicos presentan su lumen lleno de espermatozoides, observándose en ellos la presencia de pequeños grupos de oogonias y oocitos previtelogénicos. Dichos acinos oogénicos incipientes se observan en estrecha relación con los extremos redondeados de los acinos espermatogénicos (Fig. 10-C). La madurez reproductiva al considerar los acinos oogénicos se caracteriza por la presencia de oocitos vitelogénicos (Fig. 10-D).

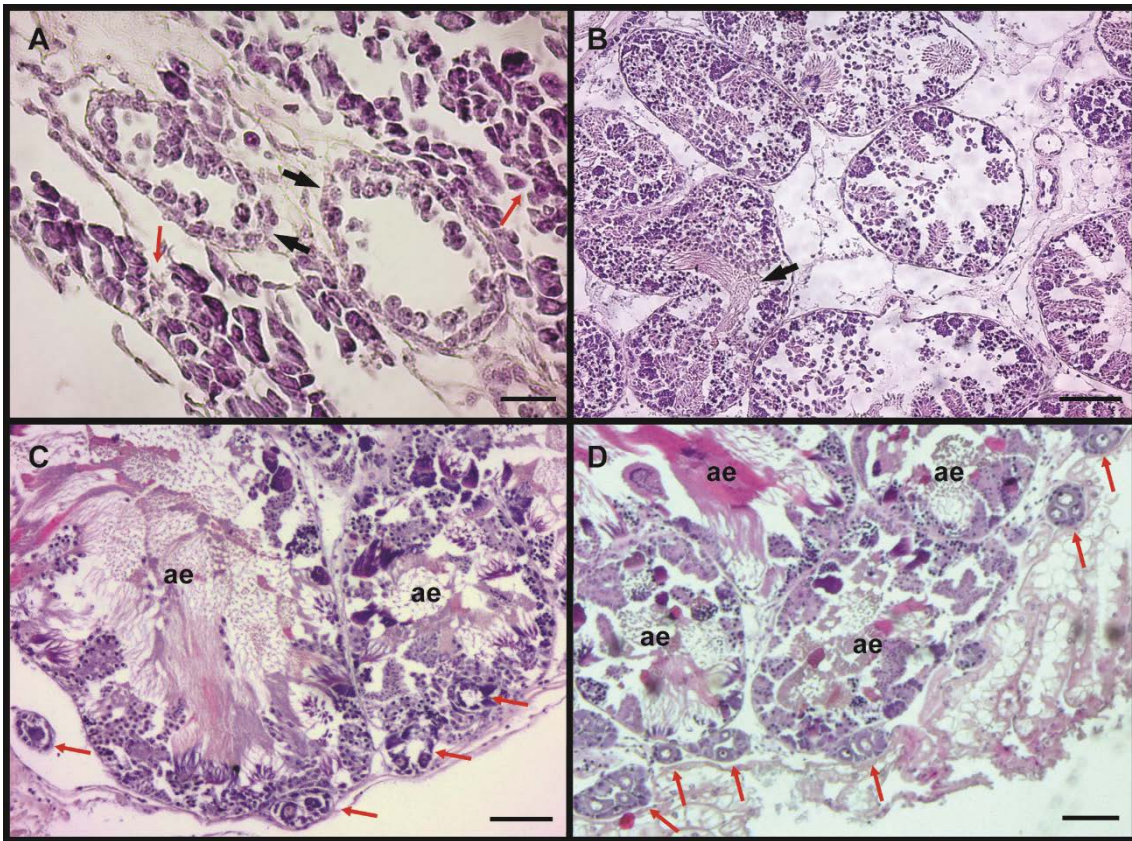


Figura 10. Madurez reproductiva A: Acinos espermátogénicos en formación (flechas negras). Ausencia de acinos oogénicos. Las flechas rojas señalan las células germinales primordiales. B: Acino espermátogénico maduro con todos los estadios germinales incluyendo espermatozoides con sus colas ocupando el lumen acinar (flecha negra). Ausencia de acinos oogénicos. C: Acinos espermátogénicos maduros con presencia de espermatozoides en su lumen. Acinos oogénicos inmaduros en formación (flechas rojas). D: Acinos espermátogénicos maduros con presencia de espermatozoides en su lumen. Acinos oogénicos maduros, con presencia de oocitos vitelogénicos en su lumen (flechas rojas). Abreviaciones: ae: acinos espermátogénicos. Escalas: A: 20  $\mu\text{m}$ ; B, C, D: 100  $\mu\text{m}$ . Fotografías: Verena Bökenhans.

### Ciclo gametogénico

Para facilitar la comprensión del ciclo gametogénico de los individuos maduros, se establecieron tres estadios para el ciclo espermátogénico y cinco para el ciclo oogénico, que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Estadios del desarrollo gonadal.

<b>Estadios</b>	<b>Ciclo espermatogénico</b>	<b>Ciclo oogénico</b>
Proliferación	Presencia de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. Ausencia de espermatozoides.	Presencia de oogonias.
Pre-vitelogénesis	--	Presencia de oogonias y oocitos previtelogénicos.
Crecimiento	Presencia de espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides cuyas colas ocupan el lumen del acino.	Presencia de oogonias, oocitos previtelogénicos y oocitos vitelogénicos menores a 80 $\mu\text{m}$ .
Pre-evacuación	--	Oocitos maduros con diámetros mayores a 80 $\mu\text{m}$ .
Evacuación	Lumen con espacio vacío o con pocos espermatozoides.	Lumen con espacio vacío.

### *Ciclo espermatogénico*

Durante todo el año se registró actividad espermatogénica, reconociéndose todos los estadios espermatogénicos en todos los meses muestreado (Fig. 11). Durante los meses de abril y mayo se observa un mayor porcentaje de proliferación, disminuyendo progresivamente hacia febrero. La evacuación fue registrada durante todos los meses de muestreo, observándose vaciamientos parciales de los acinos, registrándose un aumento a partir del mes de agosto (8.33%) hasta febrero (50%).

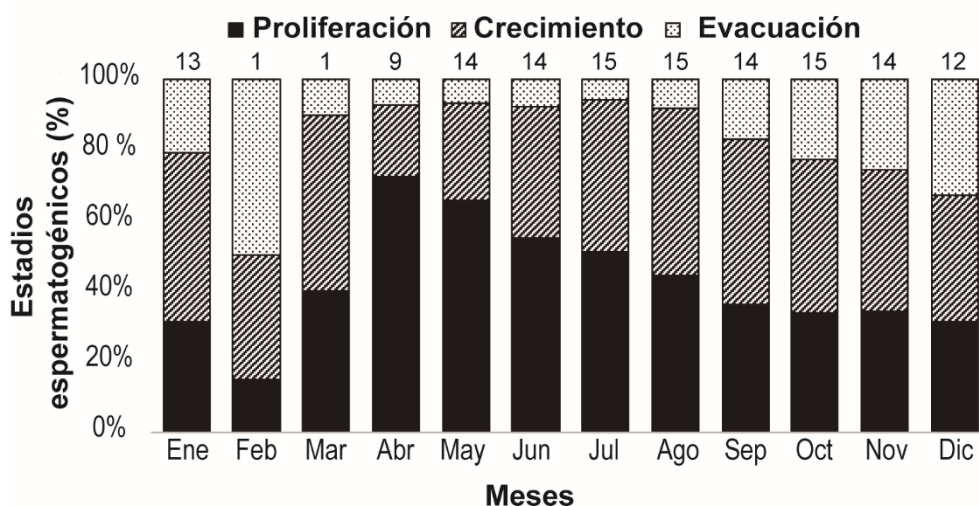


Figura 11. Ciclo espermatogénico anual. Porcentaje mensual de estadios espermatogénicos comprendidos durante el período Octubre 2015-Septiembre 2016. El número sobre cada barra indica el número de individuos maduros encontrados para cada mes. Durante este análisis fueron excluidos aquellos individuos inmaduros o post-reproductivos.

### *Ciclo oogénico*

Se registró la presencia de todos los estadios oogénicos durante todo el año, a excepción del mes de abril, mayo y julio (en junio apenas de 0,83%) donde no se observó evacuación (Fig. 12). El desarrollo de oocitos (estadio de proliferación, pre-vitologénesis y crecimiento) se observó durante todos los meses del año con una prevalencia mayor al 60%. La evacuación fue registrada de manera continua desde agosto a marzo (con mayor relevancia en febrero (10%), observándose como vaciamientos parciales de los acinos.

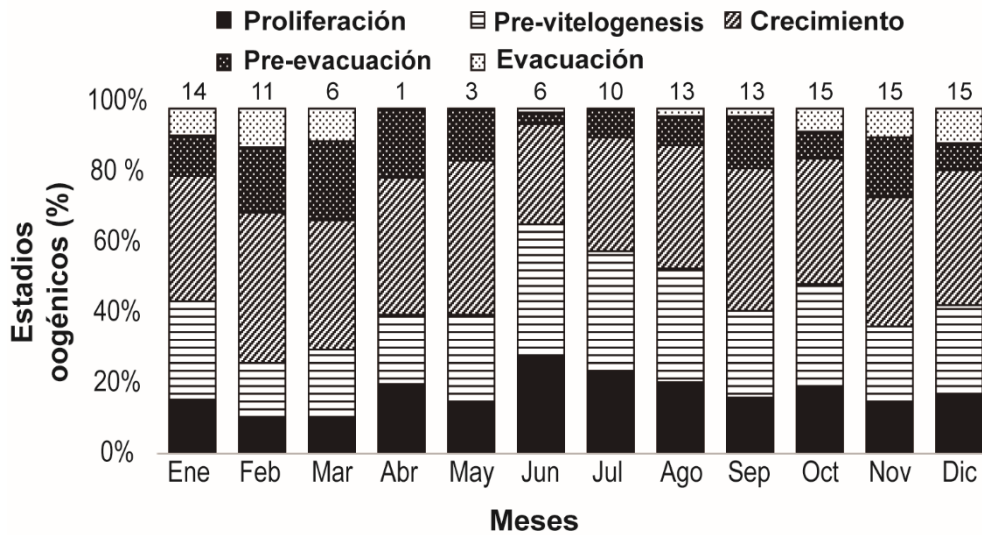


Figura 12. Ciclo oogénico anual. Porcentaje mensual de estadios oogénicos comprendidos durante el período Octubre 2015-Septiembre 2016. El número sobre cada barra indica el número de individuos maduros encontrados para cada mes. Durante este análisis fueron excluidos aquellos individuos inmaduros o post-reproductivos

#### *Frecuencia de tallas oocitaria*

La talla mínima del diámetro de los oocitos fue de 9,35  $\mu\text{m}$  en junio y la talla máxima fue 120,42  $\mu\text{m}$  en diciembre (Fig. 13). Se observa un predominio de las tallas oocitarias menores a 80  $\mu\text{m}$  (oocitos en crecimiento) durante todos los meses, reflejando una activa proliferación y crecimientos de oocitos durante todo el año (Fig. 13). De julio a marzo, se observa un aumento en la frecuencia de oocitos mayores a 80  $\mu\text{m}$ , correspondientes a oocitos vitelogenicos prontos a ser evacuados (período de oviposición) (Fig. 13). A su vez, la frecuencia de oocitos desarrollados mayores a 80  $\mu\text{m}$  aumenta entre octubre y febrero. *P. maculata* muestra un ciclo continuo de proliferación de gametas durante todo el año, sin contar con un período de reposo, ni fase de recuperación. Es necesario destacar que se observa una variación en el número total de individuos que presentan sus acinos oogénicos maduros (n) entre meses, disminuyendo drásticamente de enero a abril y aumentando de mayo a septiembre (Fig. 13).

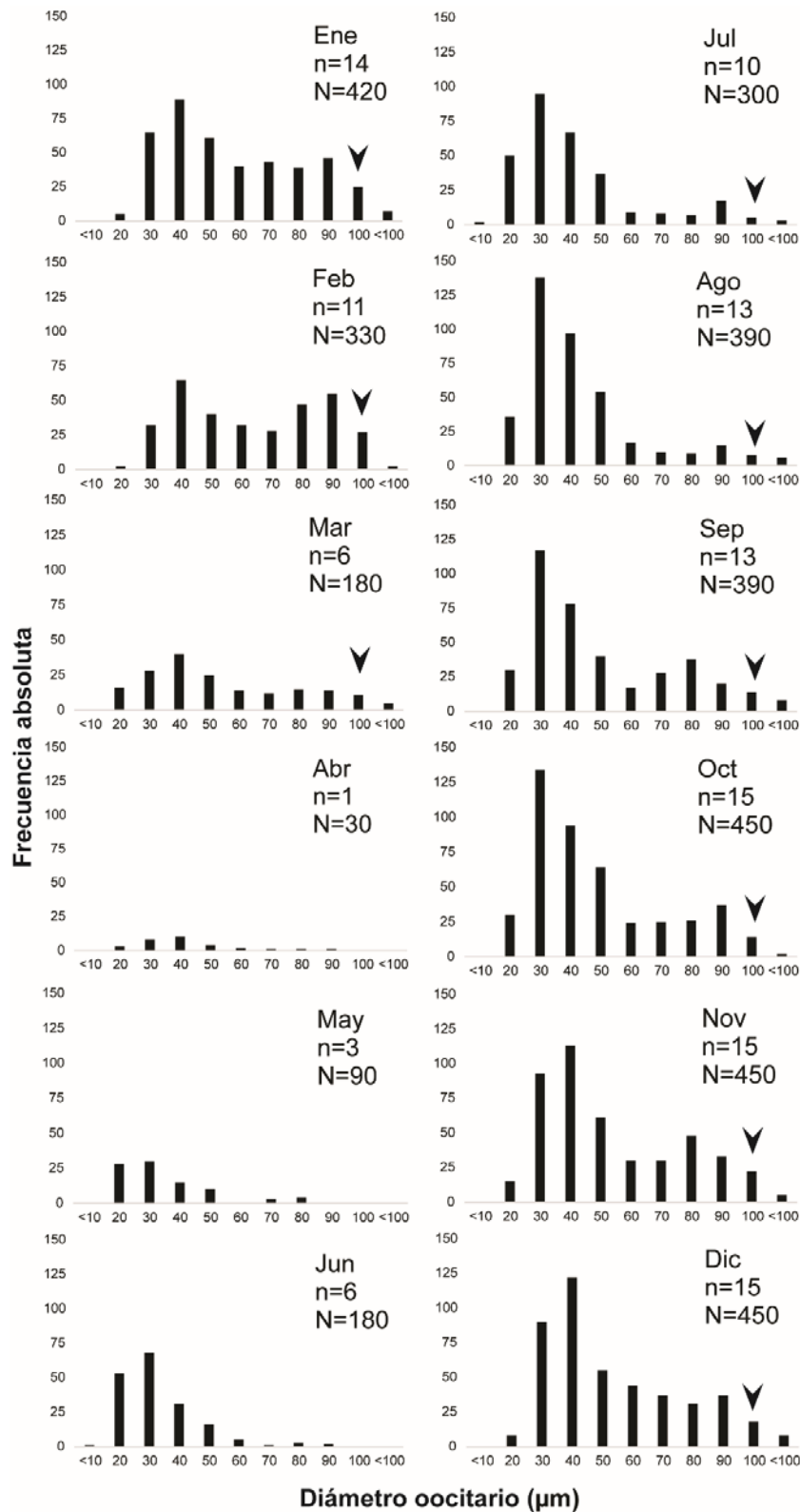


Figura 13. Histogramas de frecuencias de tallas oocitarias mensuales (octubre 2015-septiembre 2016), donde se representa el número de oocitos en función de las diferentes clases de tallas oocitarias. N: número total de oocitos medidos mensualmente, n= número total de individuos que presentan sus acinos oogénicos maduros y fueron utilizados para la construcción de los histogramas. (Cabeza de flechas: evacuación de oocitos).

Durante los muestreos estacionales se observó el mismo patrón en la frecuencia de tallas oocitarias, así como una variación similar en el número de individuos que presentan sus acinos oogénicos maduros (n) (Fig. 14).

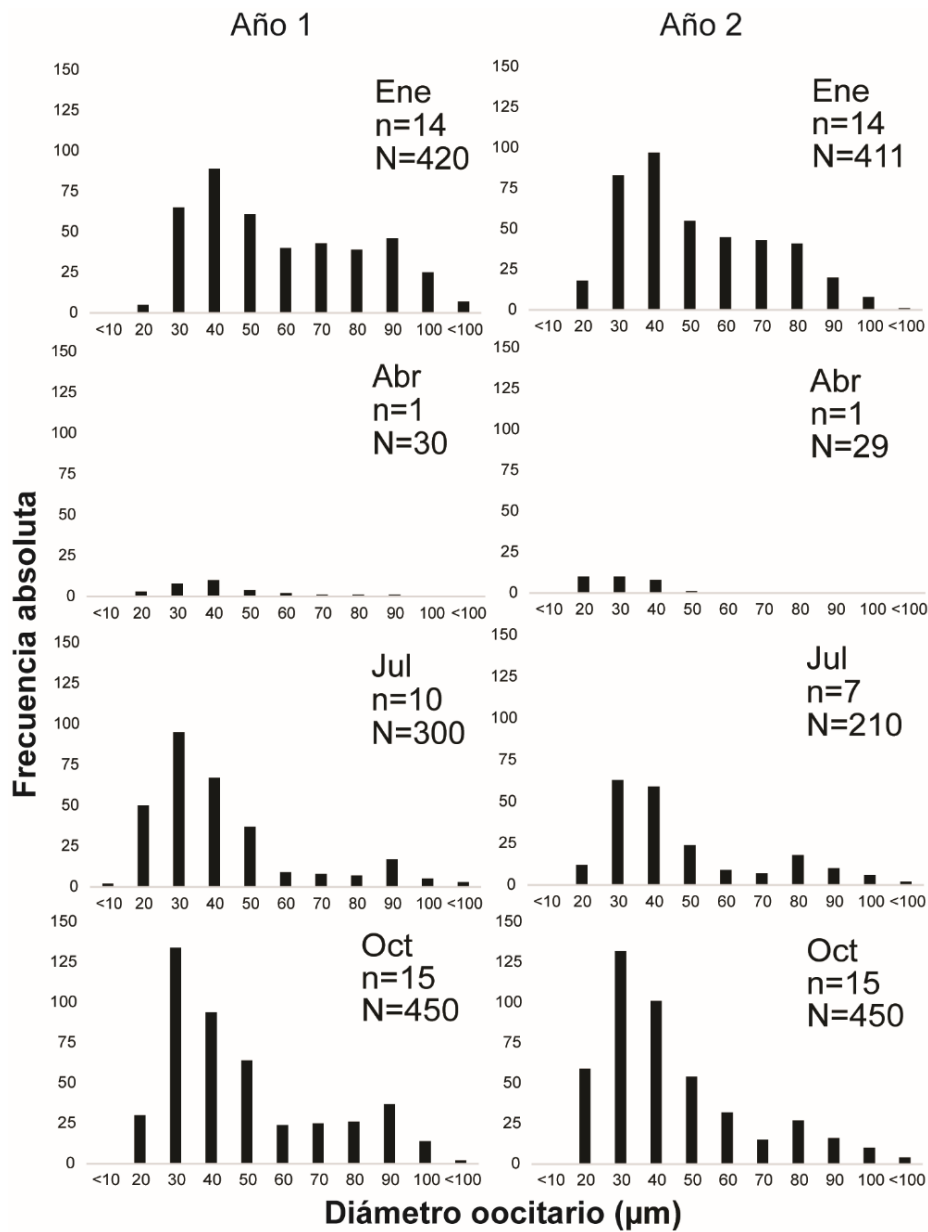


Figura 14. Histogramas de frecuencias de tallas oocitarias estacionales durante dos años de muestreo (octubre 2015 - julio 2017), donde se representa el número de oocitos en función de las diferentes clases de tallas oocitarias. N: número total de oocitos medidos mensualmente, n= número total de individuos que presentan sus acinos oogénicos maduros y fueron utilizados para la construcción de los histogramas.

### Desorganización en los acinos

En algunos acinos espermatoogénicos se observó una desorganización espacial de sus estadios celulares. En estos casos, todos los estadios celulares se visualizan mezclados en el lumen de los acinos (Fig. 15-A) y pierden la agrupación en racimos (Fig. 15-B). Sin considerar aquellos individuos inmaduros, el 48,12% de los individuos muestreados a lo largo de un año (N=164) presentaron algún grado de desorganización, siendo este porcentaje muy variado entre los meses. En mayo (0%) y junio (8,3%) prácticamente no se observaron acinos espermatoogénicos desorganizados entre los individuos muestreados. De julio a noviembre, más del 40% de los individuos presentaron algún grado de desorganización en sus acinos espermatoogénicos, aumentando hacia diciembre (73,3%) y enero (73,3%). En febrero el 100% de los individuos muestreados presentaron algún grado de desorganización.

El porcentaje de los acinos espermatoogénicos que presentaron desorganización varió entre individuos, pudiéndose observar zonas de desorganización que ocupan de manera parcial o total algunos acinos, o bien verse representado en la totalidad de los acinos espermatoogénicos de la gónada (Fig. 16). A su vez, se observó un aumento del porcentaje promedio de la fracción de la gónada afectada por la desorganización a partir de junio, con un notorio incremento de diciembre hasta marzo (Fig. 16).

Ocasionalmente, se pudieron observar todos los estadios espermatoogénicos mezclados en las divisiones del ducto hermafrodita presentes en la gónada (ver Resultados-*Estructura gonadal*) (Fig. 15-C). A su vez, se registró la presencia de gránulos de vitelo sueltos en el lumen de los acinos espermatoogénicos en un 18,29% de los individuos muestreados (N=164) (Fig. 16-E).

No se observó desorganización espacial entre estadios celulares en los acinos oogénicos, sin embargo, en algunos casos se observó la intrusión de espermatozoides en los mismos (Fig. 15-E, F). Este evento fue observado desde octubre hasta febrero en 14% del total de los individuos muestreados, sin embargo se observó en muy pocos acinos por individuos (con un máximo de 3 acinos). Por lo tanto, el porcentaje de desorden mensual observado no fue calculado.

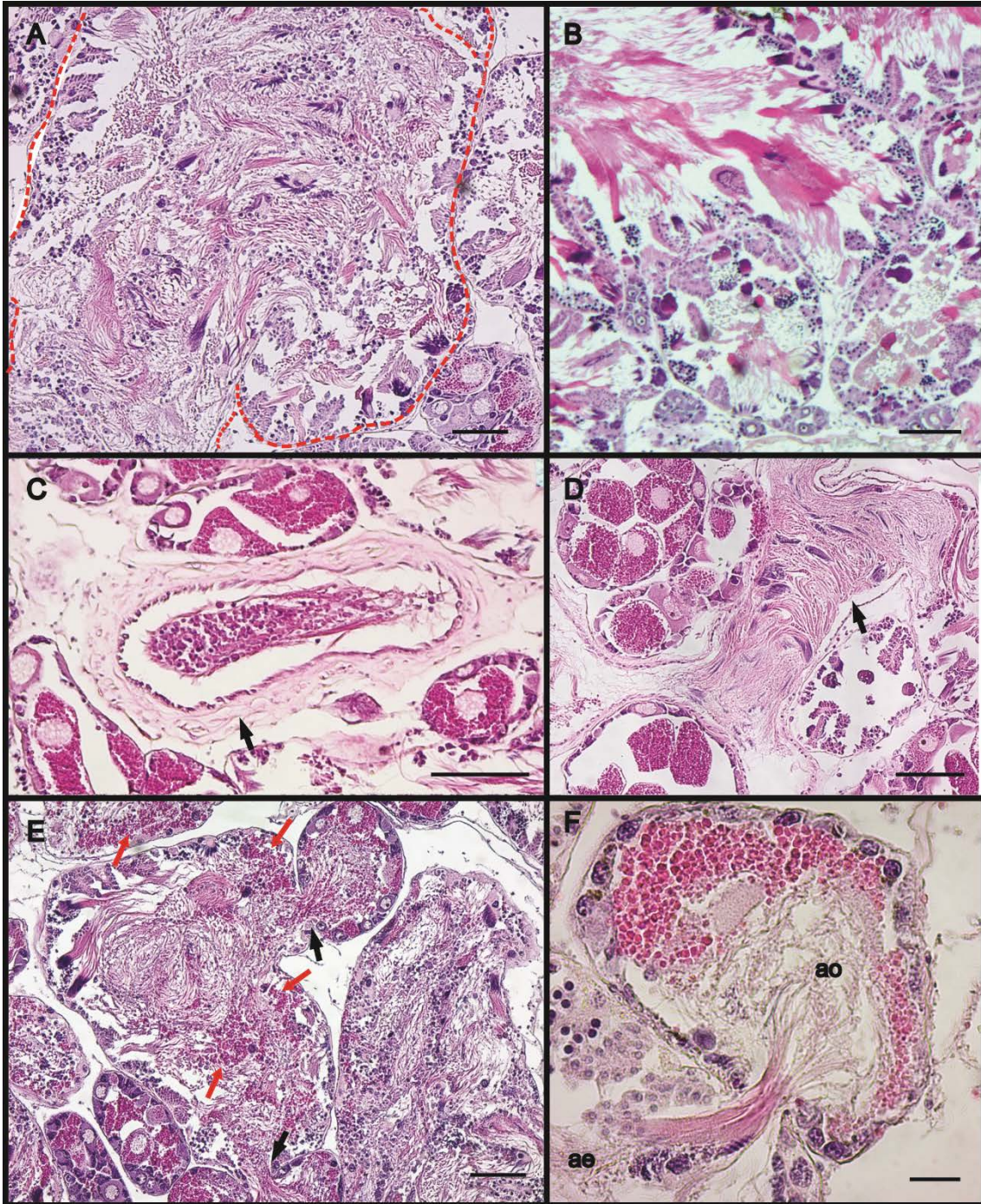


Figura 15. Desorganización en los acinos gametogénicos de *Pleurobranchaea maculata*. A: Estadios espermatogénicos mezclados en el acino espermatogénico. La línea punteada muestra el límite del acino. B: Acino espermatogénico normal (sin desorganización) donde se observa la agrupación en racimos de los estadios gametogénicos. C: Ducto con estadios espermatogénicos mezclados (flecha negra). D: Ducto con espermatozoides maduros sin desorganización (flecha negra). E: Acinos espermatogénicos con gránulos de vitelo suelto (flecha roja). Intrusión de espermatozoides en acinos oogénicos (flecha negra). F: Detalle de espermatozoides ingresando al acino oogénico. Abreviaciones: ae: acino espermatogénico, ao: acino oogénico. Escalas: A, B, C, D, E: 100  $\mu$ m; F: 20  $\mu$ m. Fotografías: Verena Bökenhans.

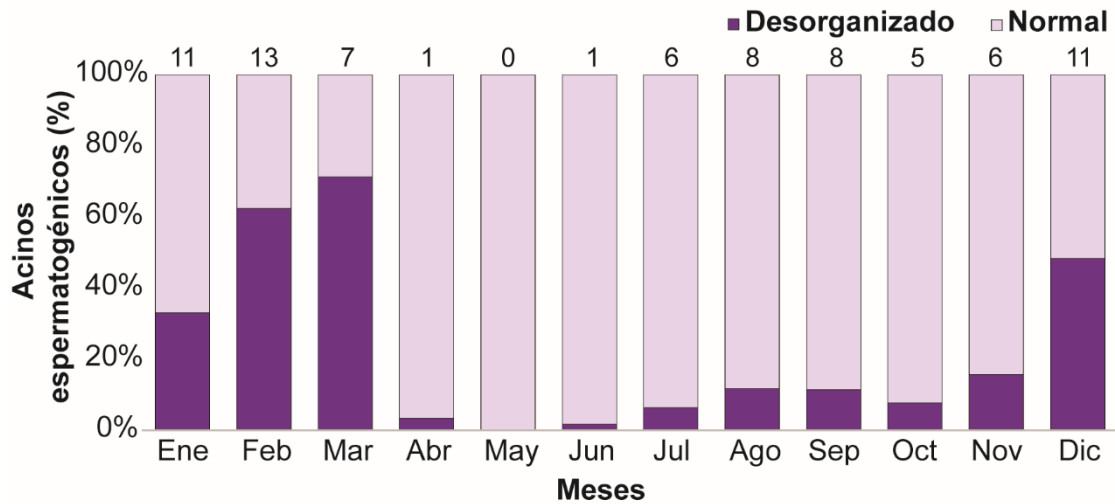


Figura 16. Porcentaje mensual promedio de desorganización gonadal observado en los acinos espermatogénicos de aquellos individuos que presentaron desorganización. El número sobre cada barra indica el número de individuos con desorganización. Período de muestreo: Octubre 2015-Septiembre 2016.

#### 4. Deterioro de los acinos

En algunos individuos, a lo largo de la membrana basal de ambos acinos gametogénicos se observaron signos de degradación mediante la presencia de cuerpos amarillos y un engrosamiento de la membrana basal, la cual toma aspecto irregular (Fig. 17-A, B). En los acinos espermatogénicos los cuerpos amarillentos se concentran, principalmente, en cercanías de las células de Sertoli (Fig. 17-A). Luego, ambos acinos gametogénicos pierden su contenido restante, se reducen en tamaño y se observa un aumento del tejido conectivo (Fig. 17-C).

Aquellos individuos cuyas gónadas presentan células amarillentas en la membrana basal de los acinos y un engrosamiento de la misma serán denominados en adelante post-reproductivos. Los signos en los individuos post-reproductivos se observan antes, y de manera más marcada, en los acinos espermatogénicos que en los oogénicos.

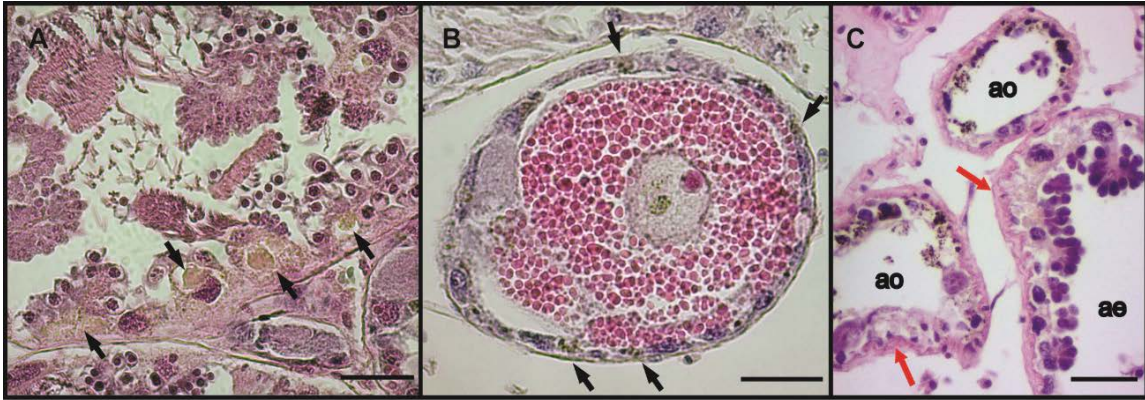


Figura 17. Deterioro en los acinos gametogénicos de *Pleurobranchaea maculata*. A: Presencia de cuerpos amarillentos en la membrana basal de un acino espermatogénico (flechas). B: Presencia de cuerpos amarillentos en la membrana basal de un acino oogénicos (flechas). C: Acinos gametogénicos prácticamente vacíos, con presencia de cuerpos amarillentos. Nótese la membrana basal engrosada y su lámina basal engrosada y de aspecto irregular (flechas rojas). Abreviaciones: ae: acino espermatogénico, ao: acino oogénico. Escalas: 20  $\mu\text{m}$ . Fotografías: Verena Bökenhans.

La proporción de los individuos que presentan desorganización en los acinos espermatogénicos, difieren significativamente de la proporción de individuos post-reproductivos a lo largo del año ( $p=3,23 \cdot 10^{-5}$ ). A partir de junio, comienzan a mostrar algún signo de desorganización, coincidente con la época en que los individuos se encuentran maduros (con presencia de espermatozoides). La figura 18 muestra la frecuencia de individuos post-reproductivos según las características de los acinos espermatogénicos y con algún signo de desorganización en sus acinos a lo largo de los meses.

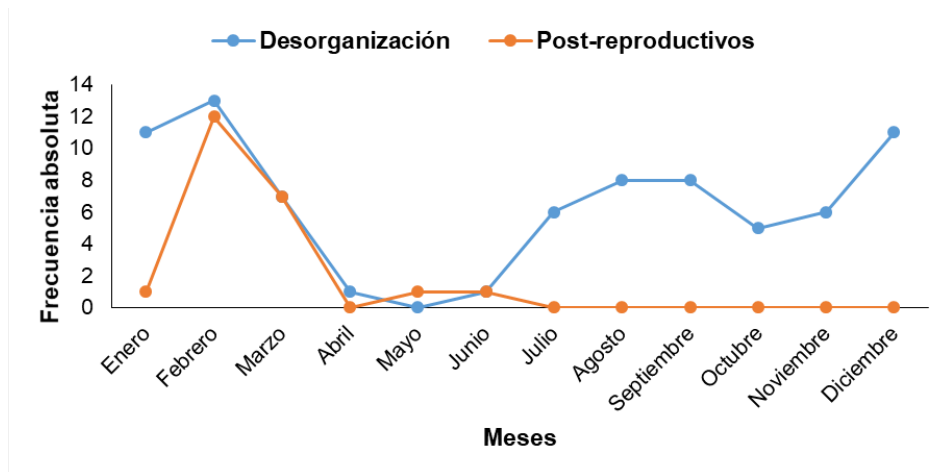


Figura 18. Frecuencia absoluta mensual de individuos de *Pleurobranchaea maculata* post-reproductivos y con algún grado de desorganización en sus acinos espermatoogénicos. N total= 191 individuos. Período de muestreo: Octubre 2015-Septiembre 2016.

#### Apoptosis en la gónada durante el ciclo de vida

A lo largo del año se observa una variación en las células apoptóticas en concordancia con el proceso de maduración gonadal. En los individuos maduros de julio, agosto, septiembre y octubre la señal positiva se concentra en los núcleos de los diferentes estadios germinales, principalmente en las espermatogonias (Fig. 19-A, B, C). En estos cortes no se observó una señal positiva en células estructurales de las membranas basales.

En el individuo maduro de noviembre, donde ambos acinos gametogénicos se encuentran maduros, no se observan núcleos apoptóticos en ningún tipo celular (Fig. 19-C, D, E).

La presencia de cuerpos amarillentos en la membrana basal de los acinos espermatoogénicos (individuos post-reproductivo de febrero y marzo), observados en las tinciones con hematoxilina-eosina, son acompañados por señales positivas a la técnica de TUNEL en los núcleos de las células de Sertoli (Fig. 19-F, G, H). A su vez, se expusieron claras señales positivas en las células asociadas a las membranas basales de los acinos oogénicos (Fig. 19-F, G, H) incluso cuando mediante la tinción con hematoxilina-eosina no se evidenciaban notorios signos de deterioro de los mismos. En etapas avanzadas de la senescencia, donde los acinos se encuentran prácticamente vacíos (individuo post-

reproductivo de abril), las señales apoptóticas disminuyen (Fig. 19-I, J, K) observándose señales positivas en algunos núcleos celulares remanentes.

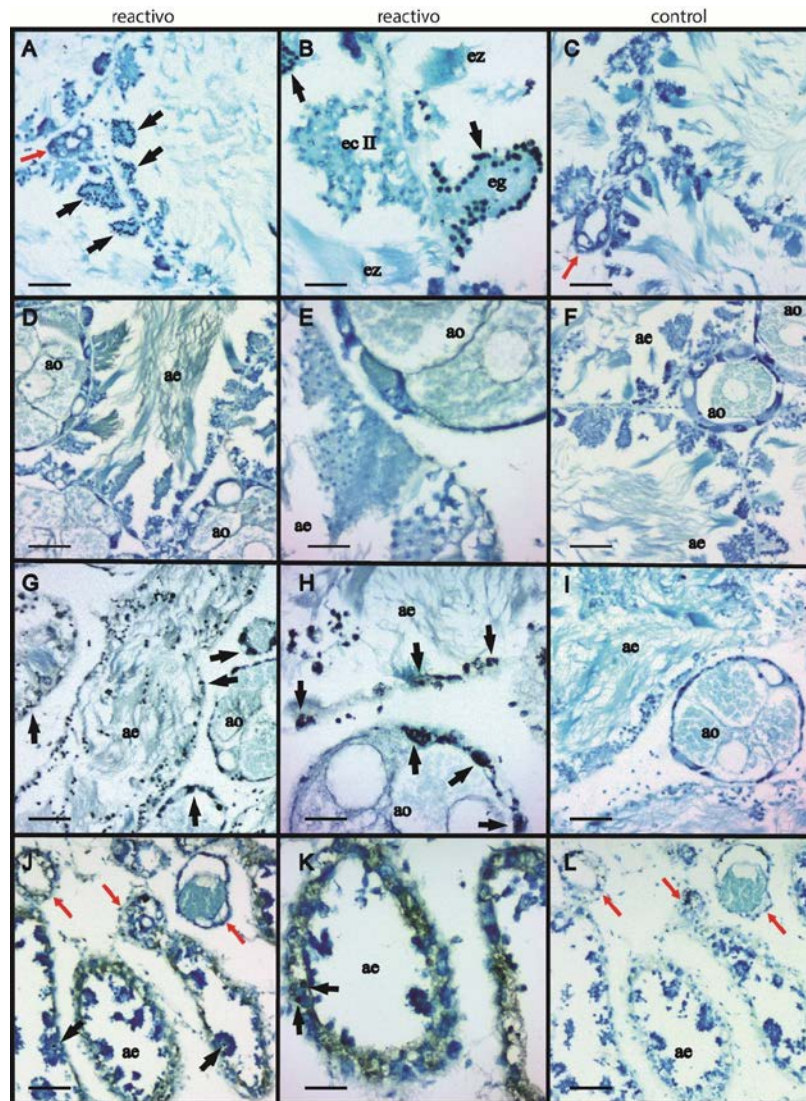


Figura 19. Evaluación de apoptosis celular mediante la técnica del TUNEL en tejido gonadal de individuos de *Pleurobranchaea maculata* de julio (A-C), noviembre (D-F), febrero (G-I) y abril (J-L). La columna control corresponde al control negativo sin reactivo (deoxynucleotidyl transferasa). A-C: Las señales positivas en los núcleos de las espermatogonias (ejemplificado mediante flecha negra). Nótese la ausencia de señal positiva en las células estructurales de las membranas basales y en las células germinales de los acinos oogénicos (flechas rojas). D-F: Ausencia de núcleos apoptóticos. G-I: Las señales positivas se observan en los núcleos de las células estructurales de la membrana basal (ejemplificado mediante flecha negra). A su vez se observan señales apoptóticas en núcleos de células germinales desorganizadas en el lumen de los acinos espermatogénicos. J-L: Las señales positivas se observan en algunos núcleos remanentes de las células de la membrana basal (ejemplificado mediante flecha negra). La flecha roja indica los acinos oogénicos. Abreviaciones: ae: acinos espermatogénicos, ao: acinos oogénicos, ec II; espermatocitos II, eg: espermatogonias, ez: espermatozoides. Escalas: A, C, D, F, G, I, J, L: 50  $\mu$ m; B, E, H, K: 20  $\mu$ m. Fotografías: Verena Bökenhans.

## 5. Ciclo de vida anual

La tabla 2 resume las características gonadales observadas en los individuos inmaduros, maduros o post-reproductivos.

Tabla 2. Individuos inmaduros, maduros o post-reproductivos según sus características gonadales.

	<b>Acinos espermatoogénicos</b>	<b>Acinos oogénicos</b>
Inmaduros	Presencia de células germinales, espermatogonias, espermatoocitos y espermátidas. Ausencia de espermatozoides.	Presencia de células germinales, oogonias y oocitos previtelogénicos. Ausencia de oocitos vitelogénicos.
Maduros	Presencia de células germinales, espermatogonias, espermatoocitos y espermátidas y espermatozoides.	Presencia de células germinales, oogonias y oocitos previtelogénicos y oocitos vitelogénicos.
Post-reproductivos	Presencia de cuerpos amarillentos en la membrana basal, la cual se encuentra engrosada y presenta aspecto irregular. Los estadios celulares pueden estar presentes de manera organizada u desorganizada o bien el acino puede encontrarse vacío.	Acinos cuyo lumen se encuentra vacíos y presentan cuerpos amarillentos en la membrana basal. Se observa la presencia de algunas células germinales en deterioro.

Al evaluar la proporción de individuos inmaduros, maduros y post-reproductivos según sus acinos espermatoogénicos, se observa una variación a lo largo del año. Entre febrero y abril se observa un predominio de individuos inmaduros, cuyo peso promedio fue de  $5,53 \pm 3,19$  g ( $X \pm SD$ ,  $N= 20$ ) (Fig. 21-A). El máximo de individuos inmaduros ocurre en marzo (55,55%). Esta proporción disminuye en abril (35,71%), con un correspondiente aumento del número de individuos maduros (64,29%) (Fig. 20-A). Entre mayo y enero prácticamente todos los individuos muestreados se encontraban maduros, presentando una amplia variabilidad en sus pesos, con un peso promedio de  $17,61 \pm 5,48$  g ( $X \pm SD$ ,  $N= 141$ ) (Fig. 20-A). Un único individuo de enero, uno de mayo y uno de junio se encontraban post-reproductivos, con presencia de cuerpos amarillentos en la membrana basal de los acinos y un engrosamiento de la misma. El mayor porcentaje de

individuos post-reproductivos se observa en febrero y marzo representados por un 66,66% y un 38,88%, respectivamente (Fig. 20-A). Sus pesos promedio fueron de  $13,89 \pm 4,96$  g ( $X \pm SD$ ,  $N= 22$ ) (Fig. 21-A).

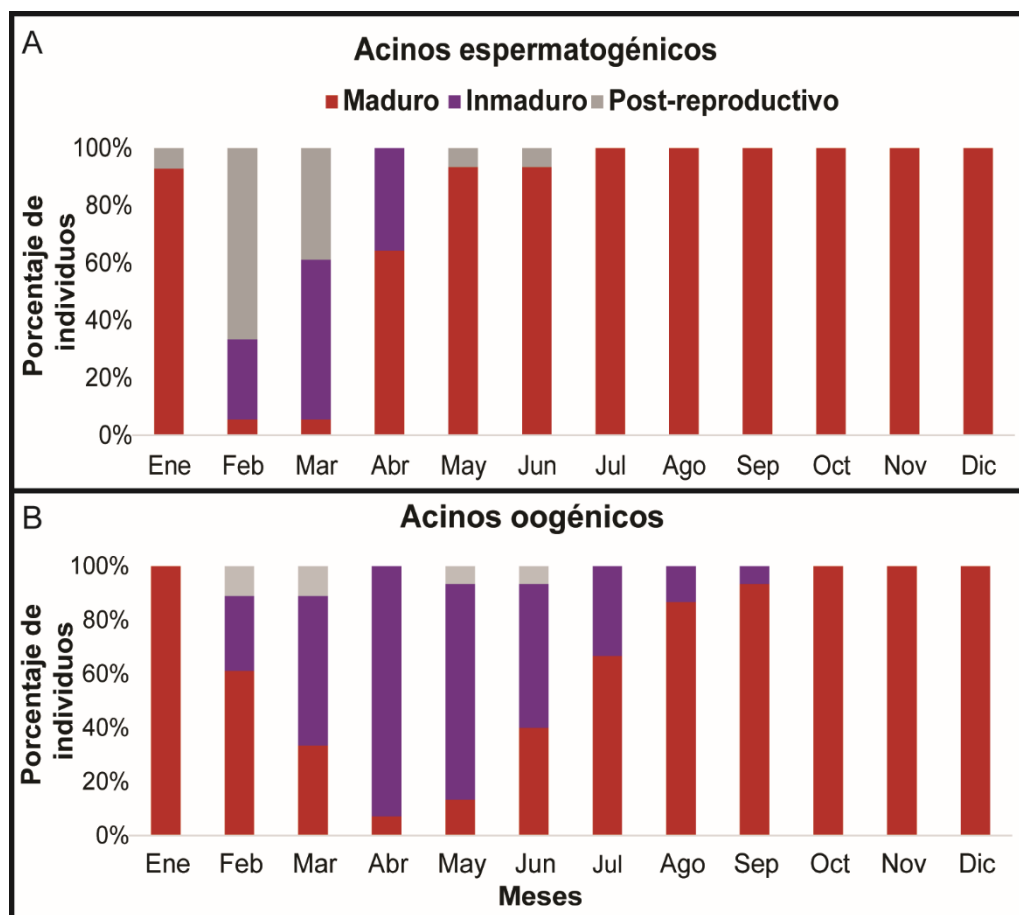


Figura 20. Porcentaje promedio de individuos que presentan los acinos espermatoogénicos (A) y los acinos oogénicos (B) maduros, inmaduros o post-reproductivos a lo largo del año comprendido entre los meses de octubre 2015 a septiembre 2016.

Al analizar la proporción de individuos inmaduros, maduros y post-reproductivos según sus acinos oogénicos, se observa que el mayor porcentaje de individuos inmaduros se ven representados durante los meses de abril (92,85%), mayo (89%) y junio (53,33%), disminuyendo progresivamente hacia septiembre (Fig. 20-B). Sus pesos variaron ampliamente a lo largo de los meses mostrando un promedio y desvío estándar de  $10,97 \pm 5,28$  g ( $N= 56$ ) (Fig. 21-B). A partir del mes de mayo incrementa progresivamente el porcentaje de individuos maduros (Fig. 20-B), con peso promedio y desvío estándar de  $17,99 \pm 5,67$  g ( $N=120$ ) (Fig. 21-B). Un bajo porcentaje de individuos post-reproductivos

se observa únicamente en los meses de febrero, marzo, mayo y junio (Fig. 20-B), variando entre 6,66% y 11,11%, con peso promedio y desvío estándar de  $12,53 \pm 4,27$  g (N=7) (Fig. 21-B).

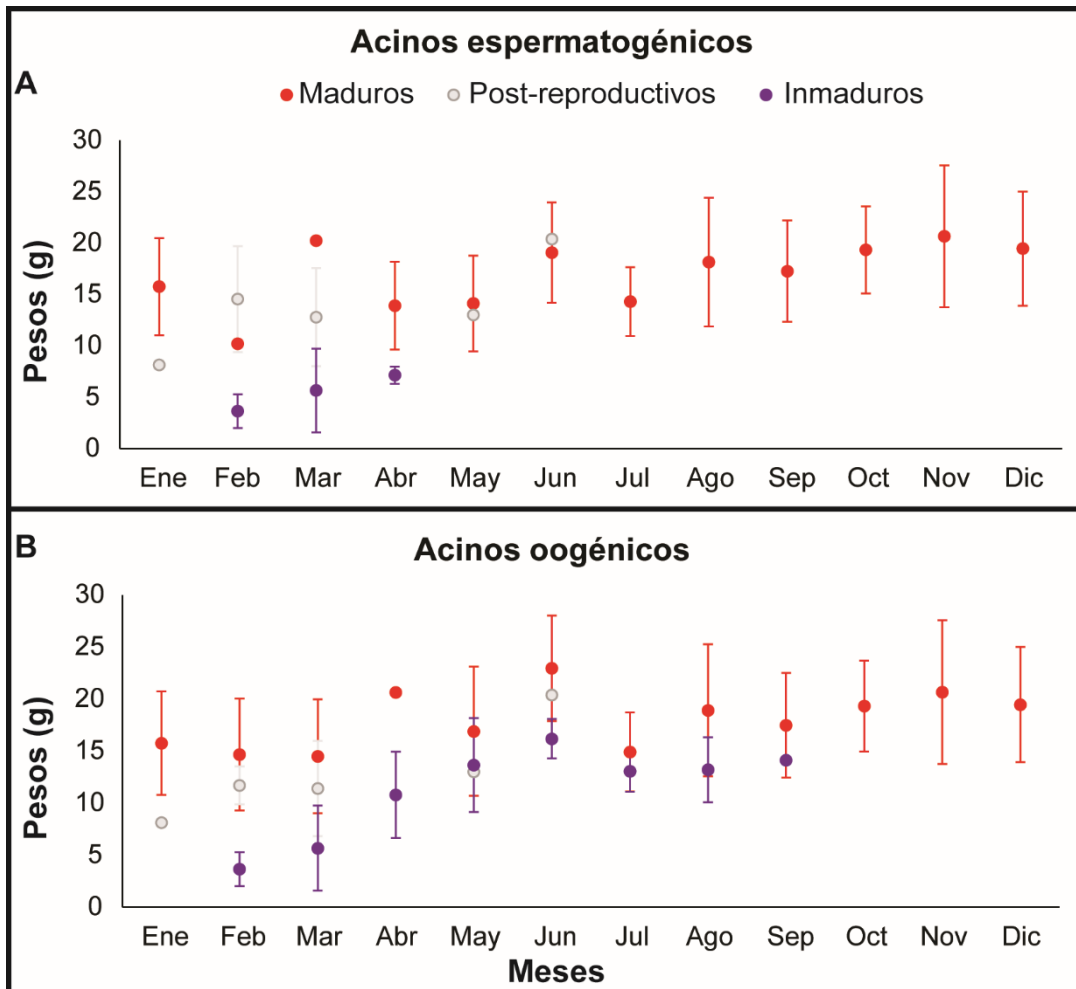


Figura 21. Peso promedio de individuos que presentan los acinos espermatoogénicos (A) y los acinos oogénicos (B) maduros, inmaduros o post-reproductivos a lo largo del año. Período de muestreo: Octubre 2015-Septiembre 2016.

## Discusión

*Pleurobranchaea maculata* muestra un comportamiento de cópula no registrado anteriormente entre los opistobranquios, observándose una etapa de transferencia interna de fluidos en la abertura genital femenina seguida de transferencias hipodérmicas post-copulatorias. Si bien la combinación de modalidades ha sido descripta con anterioridad

en otras especies de opistobranquios (Jensen 1999, Schmitt et al. 2007, Anthes et al. 2008), a diferencia de las observadas para *P. maculata*, las transferencias hipodérmicas reportadas son siempre previas a la transferencia interna de fluidos (pre-copulatorias). *Siphopteron quadrispinosum* (Cephalaspidea) realiza transferencias o inyecciones hipodérmicas pre-copulatorias mediante un pequeño estilete presente en uno de los extremos de su pene bipartito (Anthes et al. 2008), realizando una transferencia espermática unilateral. Mientras que las transferencias pre-copulatorias en *Elysia timida* (Sacoglossa) podrían ser necesarias como parte del cortejo de modo de sincronizar la transferencia espermática recíproca (Schmitt et al. 2007). En *P. maculata*, tanto la inserción de los penes como las transferencias hipodérmicas (post-copulatorias) ocurren de manera recíproca en prácticamente todos los casos observados, implicando un intercambio mutuo de fluidos. Durante las transferencias hipodérmicas en otras especies el fluido transferido puede estar compuesto exclusivamente de secreciones prostáticas (Anthes y Michiels 2007) o de una combinación de secreciones prostáticas y espermatozoides (Rivest 1984, Karlsson y Haase 2002). Esta última ha sido observada en especies cuya transferencia espermática ocurre únicamente a través de transferencias hipodérmicas (Marcus 1973, Rivest 1984, Angeloni 2003). Tal es el caso de *Alderia modesta* (Sacoglossa), en la que las transferencias hipodérmicas ocurren en cualquier parte del cuerpo de la pareja de cópula y conducen a una fecundación exitosa de los ovocitos (Angeloni 2003). Por otro lado, las secreciones prostáticas pueden presentar sustancias bioactivas (e.g. allohormonas) que inducen una respuesta fisiológica o comportamental determinada en la pareja de cópula (Koene y ter Maat 2001). Estas sustancias podrían actuar sobre la pareja aumentando la producción de huevos (Koene y ter Maat 2001, Hoffer 2012), reduciendo la producción de esperma (Hoffer 2012), inhibiendo siguientes cópulas y/o favoreciendo el almacenamiento espermático en la pareja de cópula (Koene y Chase 1998), de modo de aumentar el éxito reproductivo del donante. Los mecanismos fisiológicos a través de los que actúan estas sustancias no han sido estudiados a excepción de los efectos promovidos en el caracol terrestre *Helix aspersa*, donde el dador aumenta las posibilidades de que su esperma fecunde las gametas de su pareja de cópula mediante la alteración de órganos involucrados en el procesamiento de esperma exógeno (Koene y Chase 1998). Si bien la composición de los fluidos transferidos durante la cópula de *P. maculata* no han sido estudiados en esta Tesis, las transferencias hipodérmicas post-copulatorias registradas podrían representar una estrategia reproductiva que aumentaría su éxito reproductivo. Análisis detallados de la

composición y modo de acción de los fluidos transferidos durante las transferencias hipodérmicas de *P. maculata* son necesarias para obtener un mejor conocimiento de los efectos fisiológicos y las ventajas adaptativas que este comportamiento de cópula pueda tener en la especie.

La estructura gonadal de *P. maculata* es similar a la descrita en otras especies de opistobranquios, encontrándose en estrecha relación con la glándula digestiva (Thompson 1966, Chi-Hoon et al. 2011) y donde la formación de oocitos y espermatozoides ocurre en compartimientos separados (Reid 1964, Rivest 1984, Medina y García 1987). Si bien cada acino promueve la formación de un único tipo de células gametogénicas a veces pueden encontrarse simultáneamente espermatozoides y oocitos en un mismo acino (Medina y García 1987). Debido a la distribución periférica de los acinos oogénicos, los oocitos maduros deben pasar por los acinos espermatogénicos para ser liberados (Thompson 1966, Rivest 1984, Wägele y Willan 2000) lo que sugiere una comunicación entre acinos (Medina y García 1987). Esta estrecha relación probablemente posibilite la intrusión de espermatozoides a los acinos oogénicos. La presencia de gránulos de vitelo sueltos en los acinos espermatogénicos posiblemente se deba a la presencia de oocitos vitelogénicos degradados, como ha sido señalado en el nudibranchio *Hyselodoris tricolor* (Medina y García 1987).

La desorganización espacial de los estadios celulares observados en los acinos espermatogénicos ha sido previamente descrito en el nudibranchio *Palio zosterae* (Rivest 1984). Esta especie inyecta esperma exógeno directamente en los acinos espermatogénicos de la gónada de un conspecífico, mediante un estilete peneano. Este mecanismo reproductivo genera un aspecto desordenado de los espermatozoides en los acinos espermatogénicos, los que se sitúan de manera periférica en la gónada. A diferencia *P. zosterae*, *P. maculata* carece de estilete peneano, los acinos oogénicos se encuentran mayoritariamente distribuidos de manera periférica y presenta un período de inserción mutua de los penes durante la cópula. Por lo tanto, sería poco probable que la falta de organización observada en los acinos espermatogénicos en *P. maculata* sea consecuencia de la introducción de esperma directa durante las transferencias hipodérmicas. Por el contrario, la desorganización podría estar promovida por acción de alohormonas transferidas durante dichas transferencias post-copulatorias, produciendo posiblemente una reducción de esperma en el individuo receptor de la inyección (oligospermia) como se ha registrado en el caracol hermafrodita de agua dulce *Lymnaea*

*stagnalis* (Hoffer 2012). Sin embargo, su efecto a nivel gonadal no fue estudiado por Hoffer (2012). Si bien múltiples estudios son necesarios para corroborar la relación entre el comportamiento de transferencia post-copulatorias con la desorganización a nivel gonadal en los acinos espermatoogénicos, la desorganización observada en los acinos de *P. maculata* podría estar reflejando una estrategia de selección sexual, mediante la reducción de la espermatogénesis en los competidores.

Los signos de deterioro gonadal han sido previamente descriptos en la babosa pulmonada con ciclo de vida anual *Arion ater* (Eupulmonata) (Lüsis 1961, Parivar 1978). Los individuos de esta especie hermafrodita muestran un aumento del espacio interacinar y la presencia de material basófilo (por su afinidad a la eosina) en las células de Sertoli (Lüsis 1961), así como un engrosamiento de la membrana acinar (Parivar 1978). A su vez, en *A. ater* los signos de deterioro gonadal se vieron más marcados en los acinos espermatoogénicos que en los oogénicos, tal como fue observado en *P. maculata* (este estudio). En particular en los opistobranquios, los signos de deterioro gonadal fueron descriptos de manera aislada. En la liebre de mar *Aplysia kurodai* (Aplysiida), con ciclo de vida anual, se describe una constricción de los acinos luego del vaciamiento de los mismos al finalizar su época reproductiva (Chi-Hoon et al. 2011), promoviendo un aumento en el espacio interacinar. En el nudibranquio *Archidoris pseudoargus* los individuos moribundos presentan los acinos espermatoogénicos vacíos mientras que los acinos oogénicos muestran cantidades variables de oocitos en diferentes estadios gametogénicos (Thompson 1966). El aspecto gonadal característico de los individuos post-reproductivos observado en *P. maculata* coincide con lo descripto en estas especies hermafroditas y podrían marcar el inicio del período de senescencia. A su vez, se observan principalmente en los meses de febrero y marzo, luego de los cuales los individuos adultos desaparecen, sugiriendo una posible asociación entre el deterioro gonadal y la senescencia. Si bien las características químicas de los cuerpos amarillentos observados en la gónada de *P. maculata* no han sido estudiadas en el presente trabajo, la descripción es consistente con el material basófilo observado en *A. ater*. Por otro lado, al igual que en *A. ater* y en *A. pseudoargus*, los signos de deterioro gonadal en *P. maculata* se ven más marcados en los acinos espermatoogénicos que en los oogénicos. Por lo tanto, el deterioro gonadal observado en los acinos espermatoogénicos posiblemente refleja de manera más asertiva el estado general del individuo hacia el final de su vida.

En *P. maculata* la espermatogénesis se completa antes que la oogénesis, al igual que en otras especies de opisthobranchios (Thompson 1966, Lancaster 1983, Chi-Hoon et al. 2011), sugiriendo que los individuos podrían copular y almacenar esperma en los receptáculos seminales hasta que los oocitos estén listos para su fecundación. La actividad gametogénica observada en *P. maculata* durante el muestreo anual sugiere que la especie presentan un ciclo continuo de proliferación de gametas durante todo el año, sin contar con un período de reposo, ni fase de recuperación, característicos de una especie semélpara. A su vez, al considerar el ciclo gametogénico y el deterioro gonadal en conjunto con la presencia de diferentes tipos de células gonadales que sufren apoptosis durante el ciclo gametogénico, la especie presentaría un ciclo de vida anual, luego del cual morirían. Durante los meses de febrero y marzo coexisten individuos post-reproductivos con individuos inmaduros de una nueva cohorte, observándose raramente individuos maduros. Si bien *P. maculata* mostró actividad espermatogénica y oogénica durante todo el año, la actividad espermatogénica tanto en febrero como en marzo quedó representada por un único individuo maduro para esa época del año. Durante estos meses, gran parte de los individuos muestreados presentaban gónadas inmaduras, post-reproductivas, o bien maduras con un alto grado de desorganización imposibilitando el análisis de ciclo gametogénico. Probablemente los pocos individuos maduros encontrados podrían representar individuos levemente retrasados del ciclo gametogénico, ya sea porque lograron un asentamiento larval exitoso más tardío o bien presentaron mayor reserva de los tejidos somáticos, como observó Thompson (1966) en el nudibranchio *Archidoris pseudoargus*. Lo mismo se observó durante la actividad oogénica en el mes de abril. La presencia de oocitos maduros se observa entre los meses de julio a febrero, durante estos meses las evacuaciones son parciales de modo que no se observa un vaciamiento completo de los acinos post-evacuación, pudiendo presentar varios eventos de liberación de gametas a lo largo del año. De este modo, se esperaría encontrar masas ovígeras en el campo durante los meses en los que la totalidad de los individuos muestreados se encuentren maduros, en especial entre octubre y enero. Estos resultados coinciden con la densidad de puestas observada en el campo (ver Capítulo II- *Masas ovígeras y desarrollo embrionario*).

A su vez, el ciclo de vida anual de *P. maculata* relacionado a que la especie podría ser semélpara, se evidencia en los diferentes tipos celulares apoptóticos a lo largo de su ciclo gametogénico. La apoptosis es un proceso biológico fundamental que ocurre

principalmente durante el comienzo del desarrollo y el envejecimiento de los organismos (Romero et al. 2015), a través del cual un organismo elimina las células indeseables garantizando la homeostasis de los tejidos (Cristofolini et al. 2013, Romero et al. 2015). Existe un amplio consenso en cuanto a la regulación de la gametogénesis a través de la apoptosis de células germinales, de modo de garantizar un balance entre proliferación y muerte de las células germinales (Billig et al. 1996, Hsueh et al. 1996, Ma et al. 2017, Liang et al. 2019). La apoptosis, como función regulatoria, suele observarse principalmente en espermatogonias y espermatocitos (Hasegawa et al. 1997, Nakagawa et al. 1997, Ma et al. 2017, Liang et al. 2019), al igual que lo observado en *P. maculata* durante las etapas tempranas del ciclo gametogénico. La ausencia de núcleos apoptóticos observada en el individuo de noviembre (individuo con espermatozoides y oocitos maduros) se asocia con una mayor demanda espermática durante la época de cópula. En etapas tempranas del estadio post-reproductivo, la reaparición de células apoptóticas, en células asociadas a la membrana sugiere una relación con la degeneración del tejido gonadal, luego de la estación de puesta. El número de células gametogénicas disminuye en etapas avanzadas del estadio post-reproductivo y en consecuencia disminuye el número de células apoptóticas, marcando el final del ciclo reproductivo en *P. maculata*, debido que a partir de un tejido degenerado no puede reiniciar un nuevo ciclo reproductivo (Lüsis 1961).

Se concluye que *P. maculata* presenta un mecanismo de cópula que hasta el momento no ha sido descrito para otras especies de opistobranquios en el que se combina una etapa de transferencia interna con una etapa de transferencia hipodérmicas post-copulatorias, con un alto grado de reciprocidad. A su vez, las evidencias obtenidas sugieren que *P. maculata* es una especie semélpara con un ciclo de vida anual. En este sentido, resulta congruente que los individuos alcancen rápidamente la madurez reproductiva, la cual se extiende por varios meses durante los cuales presentan varios eventos de liberación de gametas, antes de su senescencia. Además, presenta una mayor actividad reproductiva entre agosto y enero, encontrándose durante los meses de febrero y marzo principalmente individuos senescentes e inmaduros.

**CAPÍTULO II:  
MASAS OVÍGERAS  
Y  
DESARROLLO EMBRIONARIO**



## Introducción

La amplia diversidad de especies de gasterópodos marinos se refleja en una gran variedad de tipos de puestas (Rawlings 1990). Entre los opistobranquios se observa una variedad de masas ovígeras que, en todos los casos, consisten en numerosos huevos dispuestos de manera individual o en grupos dentro de ovicápsulas, las cuales son embebidas en una matriz gelatinosa (Gibson y Chia 1989, Bandel 1976). Las masas ovígeras protegen a los embriones restringiendo la depredación, previniendo ataques bacterianos y actuando como filtros contra la radiación ultravioleta (Pechenik et al. 1984, Rawlings 1990, Rawlings 1999, Cancino et al. 2003). A su vez, el tamaño de las masas ovígeras en conjunto con la distribución de los huevos dentro de las mismas son fundamentales para garantizar un correcto suministro de oxígeno a los embriones en desarrollo (Fernández et al. 2007, Cancino et al. 2003). Tanto las formas y estructuras características de las masas ovígeras, como la distribución y proporción de los huevos dentro de las puestas difieren entre especies de opistobranquios y revisten valor taxonómico (Gibson 2003, Klussmann-Kolb y Wägele 2001).

Por otro lado, el tamaño de los huevos de los opistobranquios es muy variable y se encuentra relacionado con el tiempo y tipo de desarrollo embrionario (Domènec Ros 1981, Hadfield y Miller 1987, Goddard 2004). En la mayoría de los Nudipleura el desarrollo embrionario concluye con la eclosión de larvas planctotróficas, las cuales se desarrollan a partir de huevos más pequeños ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ) que los que presentan larva lecitotrófica o desarrollo directo (Domènec Ros 1981, Gibson 2003, Goddard 2004). Las larvas planctotróficas deben crecer en la columna de agua alimentándose del plancton durante semanas o meses antes de su asentamiento enfrentando altas tasas de mortalidad (Pawlik y Hadfield 1990, Goddard 2004). Por ello, el número de huevos por puesta asociados con este tipo de desarrollo suele ser muy grande, lo cual probablemente ayuda a maximizar el potencial de reclutamiento (Vance 1973, Strathmann 1985, Goddard 2004).

El ciclo de vida predominante entre los opistobranquios es la semelparidad anual (Todd y Doyle 1981, Todd 1983, Jones 1996); sin embargo, se han descrito especies semélparas bienales como el nudibranquio *Archidoris pseudoargus* (Davies 1993) y *Pleurobranchaea meckelii* (Pleurobranchaeidea), y raramente especies con ciclos de vida iteróparas como el nudibranquio *Cadlina laevis* (Davies 1993). Las especies iteróparas pueden presentar varios períodos de oviposición a lo largo de su vida, mientras que las

especies semélparas se caracterizan por presentar un único período de ovoposición (con uno o varios eventos de desove) y sus ciclos reproductivos se encuentran sincronizados de modo de asegurar que las larvas sean liberadas o se desarrollen durante el período de abundancia de alimento (Schroeder 1987, Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán 2016).

Diversas señales ambientales, principalmente la temperatura y el fotoperiodo, promueven la sincronización de los ciclos reproductivos (Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán 2016). En las zonas templadas, donde las fluctuaciones térmicas diarias y estacionales son muy amplias, el ciclo anual del fotoperiodo es el factor ambiental más estable y predecible (Sokolove y McCrone 1978, Olive 1995, Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán 2016), presentando un efecto directo en la estacionalidad reproductiva de numerosas especies marinas (Bigatti et al. 2008). En particular, en especies semélparas la temperatura podría promover el desarrollo gonadal, mientras que el fotoperiodo regularía la madurez reproductiva y en consecuencia el período de oviposición, aunque existen excepciones (Sokolove y McCrone 1978, Olive 1995, Sternberg et al. 2010). Se cuenta con poca información acerca de los mecanismos de regulación endócrina que controlan la oviposición en los opistobranquios (Ram et al. 1977) y más aún sobre su interacción con los factores ambientales. En la liebre de mar *Aplysia californica* (Opisthobranchia) se ha demostrado que el fotoperiodo presenta un efecto directo en la frecuencia de oviposición, siendo mayor a menor cantidad de horas de luz (Wayne y Block 1992). Sin embargo, el fotoperiodo no presentaría efecto sobre el desarrollo embrionario, como ha sido demostrado en el nudibranchio *Diaulula punctuolata* (Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán 2016).

Por otro lado, se ha reportado que la temperatura presenta un efecto directo en las tallas de eclosión embrionarias y el tiempo total de desarrollo intracapsular (Fernández et al. 2007). En general, un aumento en la temperatura disminuye el tiempo de desarrollo y aumenta la talla embrionaria (Dehnel y Kong 1979, Todd y Havenhand 1985, Thompson y Jarman 1986, Przeslawski 2004, Watt y Aiken 2003, Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán 2016) siempre dentro de los rangos específicos de tolerancia térmica, los cuales dependen de la temperatura del hábitat de la población estudiada (Fernández et al. 2007, Sorte et al. 2011).

La temperatura superficial del agua de mar en las costas Argentinas varía según un gradiente latitudinal, alcanzando en promedio un máximo en el extremo norte de 22°C (Mar del Plata), mientras que en su extremo sur (Ushuaia) se registra en promedio una

mínima de 5°C ([www.seatemperature.info](http://www.seatemperature.info)). El amplio rango térmico puede condicionar el potencial de invasión de *Pleurobranchaea maculata* (Walther et al. 2013), debido a que la tolerancia térmica durante su desarrollo puede actuar como un factor limitante.

En el presente capítulo se realizó una descripción detallada de la masa ovígera de *P. maculata* con estimación del número de puestas por individuo y número de huevos por puesta. Además, se estudió la relación del período de oviposición y desempeño reproductivo con el fotoperiodo. A su vez, se describió el desarrollo embrionario y se estudiaron los tiempos de desarrollo embrionario a diferentes temperaturas, de modo de proporcionar información de base que resultan de fundamental importancia para la realización de planes de monitoreo y manejo eficientes para esta especie invasora a lo largo de la costa Argentina.

## **Materiales y métodos**

### **1. Masas ovígeras**

#### Descripción de la puesta

Las masas ovígeras de *Pleurobranchaea maculata* encontradas en el campo fueron recolectadas mensualmente durante un año (octubre 2015 - septiembre 2016). Se recolectaron hasta un máximo de 10 masas ovígeras mensualmente. En el laboratorio, se midió el ancho y largo total (*ver* Metodología General, *Fig. 5*), se pesaron y se fijaron en formaldehído al 4% en agua de mar. El aspecto general de las masas ovígeras fue descrito bajo lupa estereoscópica, así como por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB).

Se estudiaron un total de 111 masas ovígeras. Se registró el tamaño medio de 1274 ovicápsulas (largo y ancho máximos) y el número de huevos/embriones por ovicápsula (N=114). Todas las mediciones fueron realizadas bajo microscopio estereoscópico asociado a una cámara digital y una computadora con el software ZEN 2012. Además se estudió la relación entre el número de huevos/embriones y el tamaño de la cápsula mediante una correlación de Spearman.

Con el fin de estimar el número total de huevos/embriones y ovicápsulas en cada masa ovígera, se contabilizaron bajo lupa estereoscópica el número de huevos y ovicápsulas presentes en fragmentos de 2 mm de largo, extraídos de 10 masas ovígeras, evitando los

extremos. El número de huevos/embriones y ovicápsulas encontrados en cada segmento fue extrapolado a toda la puesta según el largo total de la masa ovígera.

### Estacionalidad reproductiva

Con el fin de evaluar la variación en la densidad de puestas encontradas en el sitio de estudio a lo largo del año, se realizaron muestreos mensuales, durante un año (mayo 2018 - abril 2019), en los cuales se contabilizó el número de puestas encontradas a lo largo de 10 transectas subacuáticas de 10 metros de largo por 2 m de ancho, ubicadas de manera equidistantes y perpendiculares a la línea de costa. Se calculó la densidad para cada transecta como  $D = N / L * A$ , donde D es la densidad por transecta de largo y ancho fijo, N es el número de observaciones por transectas, L el largo de la transecta y A el ancho de la transecta. La densidad encontrada mensualmente corresponde al promediando de las densidades calculadas para cada transecta de ese mes y son expresadas con su desvío estándar. A su vez se relacionó la densidad de puestas encontradas (número de puestas/m<sup>2</sup>) con la variación natural del fotoperiodo y la temperatura superficial promedio del agua ([www.sunrise-and-sunset.com](http://www.sunrise-and-sunset.com); [www.hidro.gov.ar](http://www.hidro.gov.ar)).

## **2. Experiencia en acuario: Ensayo de inducción a la oviposición**

El promedio de masas ovígeras que un individuo puede oviponer a lo largo de una temporada reproductiva se calculó mediante un ensayo en acuarios acondicionados, simulando la variación natural de las horas de luz a lo largo de un año. A su vez se relacionó el número de puestas encontradas en el campo durante la temporada reproductiva con el número de puestas encontradas experimentalmente. Para ello, catorce individuos de *P. maculata* fueron recolectados en julio de 2018, antes del período de oviposición en el campo para minimizar que esos individuos hayan comenzado su actividad de oviposición antes del ensayo, y mantenidos en acuarios acondicionados según descripto en Metodología General. Una cortina de “black out” fue dispuesta alrededor del acuario de modo de impedir que el fotoperiodo de la cámara de temperatura controlada interfiera con el experimento. Adicionalmente, se realizó un recambio parcial de 2/3 del agua de mar presente en el sistema una vez por semana, de modo de garantizar la calidad del agua.

Para garantizar los eventos de cópula, los ejemplares fueron colocados por parejas en jaulas y mantenidos bajo un fotoperiodo constante (9:15; Luz: oscuridad, correspondiente al solsticio de invierno) durante una semana para su aclimatación. Luego de la misma, se simuló el cambio en el fotoperiodo natural a lo largo de un año mediante dos tubos Fluorescentes de 18W/765 (con duración total del ensayo de cambio de fotoperiodo de 47 días). Para ello, se agregaron 15 minutos de luz diariamente, hasta alcanzar 15 horas de luz (Solsticio de Verano) y posteriormente, se redujeron 15 minutos al día hasta alcanzar nuevamente 9 horas de luz. Diariamente se registró el número de puestas por jaula (i.e., por pareja) y se registró el momento en que fueron depositadas las masas ovígeras, con el fin de estudiar si existió alguna relación con el cambio en las horas de luz efectuado; esto se comparó con la estacionalidad de oviposición observada en el campo. Las masas ovígeras fueron retiradas el día de su oviposición para ser estudiadas y mantener el sustrato disponible para futuras puestas.

### **3. Desarrollo embrionario**

El desarrollo embrionario y tiempo de desarrollo intracapsular se analizó mediante masas ovígeras obtenidas durante los muestreos de campo y de individuos *P. maculata* mantenidos en acuarios acondicionados. Los individuos adultos fueron alimentados regularmente según descrito en Metodología General y eventualmente con anémonas (*Parabunodactis imperfecta* y *Diadumene lineata*). Las masas ovígeras encontradas fueron colocadas en recipientes plásticos individuales con 200 ml agua de mar filtrada a 1  $\mu$ m y esterilizada con luz UV, con aireación constante. Pequeñas secciones de cada masa ovígera fueron observadas diariamente bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico. En base a los cambios morfológicos observados en los embriones se definieron 5 estadios de desarrollo intracapsular (Tabla 3).

Tabla 3. Estadios del desarrollo intracapsular.

<b>Estadio</b>	<b>Descripción</b>
0 – Huevo	Huevo sin clivar, esférico y blanco.
1 - Mórula/ Blástula	Embrión con número variable de blastómeros (macrómeros y micrómeros) previo a la gastrulación.
2 – Gástrula	Embrión esférico o con forma de corazón con invaginación del balstocele.
3 - Veliger temprana	Embrión con velo incipiente ciliado. Aparición de un primordio de conchilla en forma lenticular.
4 – Veliger	Embrión con protoconcha completa, que cubre toda la masa visceral. Estatocistos reconocibles, órganos digestivos y velos en desarrollados. Aparición de un pequeño pie ciliado.

Adicionalmente, para ver si el desarrollo embrionario es homogéneo a lo largo de toda la masa ovígera, tres segmentos de distintas zonas de una misma masa ovígera (inicio, mitad y final) fueron observados bajo microscopio óptico.

Para cada estadio de desarrollo embrionario se midieron, siempre que fue posible: largo máximo del embrión; largo total, ancho y alto de la protoconcha; ancho y alto del velo; largo del pie; ancho máximo del órgano pigmentado y ancho máximo de los estatocistos (Fig. 22).

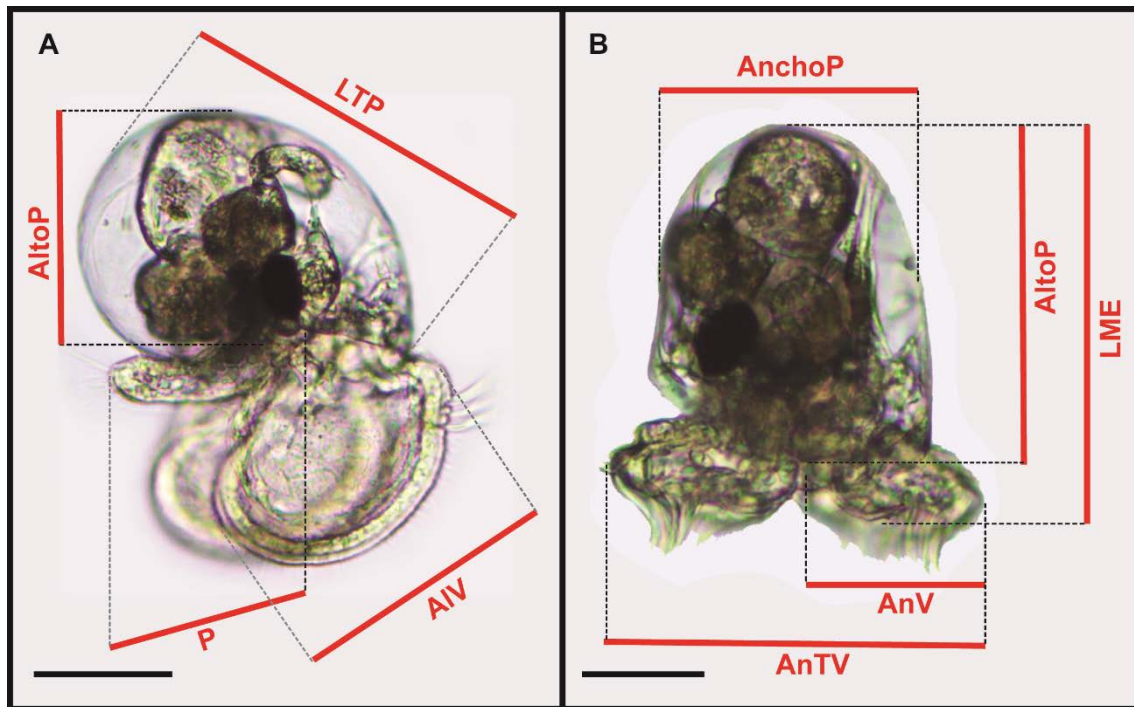


Figura 22. Medidas morfométricas embrionarias de *Pleurobranchaea maculata*. A- Vista lateral derecha del embrión en estadio veliger (día 11). B- Vista dorsal de embrión en estadio veliger (día 9). Abreviaciones: AIV: alto del velo, AltoP: Alto de la protoconcha, AnchoP: Ancho de la protoconcha, AnTV: ancho total de los velos, AnV: ancho del velo, LME: largo máximo del embrión, LTP: largo total de la protoconcha, P: largo del pie. Escalas: 50 µm. Fotografías: Verena Bökenhans.

#### 4. Experiencia en acuario: Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario

El efecto de la temperatura del agua en el tiempo de desarrollo y el tamaño de la protoconcha embrionaria al momento de la eclosión fue evaluado mediante experimentos de temperatura controlada. Para ello, ocho masas ovígeras, obtenidas al azar del ensayo anterior inmediatamente posterior a su desove (Ver: *Experiencia en acuario: Ensayo de inducción a la oviposición*) fueron fragmentadas en 5 segmentos de tamaño similar. Cada fragmento fue colocado en recipientes plásticos individuales con 100 ml agua de mar filtrada a 1 µm y esterilizada con luz UV, con aireación constante, para ser expuestas a diferentes tratamientos de temperatura (5, 10, 14, 18 y 22 °C) bajo un fotoperiodo constante (12:12; luz: oscuridad), de modo de tener 8 réplicas por tratamiento. El experimento fue realizado en la cámara de temperatura controlada del *Servicio de Acuarios Experimentales* del CCT-CENPAT (Fig. 23-A). La misma cuenta con contenedores de 30 litros, con agua dulce cuya temperatura se controló con calentadores

regulados de manera digital. Los frascos permanecieron inmersos en los contenedores, a la temperatura deseada, durante todo el experimento (Fig. 23-B).

Se controló diariamente la salinidad y temperatura de cada frasco, así como el estado general del segmento de masa ovígera bajo lupa o microscopio óptico. El agua se cambió por completo día por medio. En cada caso, se registró el tiempo total de desarrollo intracapsular como los días transcurridos hasta que se visibilizaban las primeras larvas libres. Debido a que las larvas no eclosionan todas de manera simultánea, se registró la longitud total de la protoconcha embrionaria antes de la eclosión para 25 embriones que aún se encontraban en las ovícapsulas durante el día de eclosión.

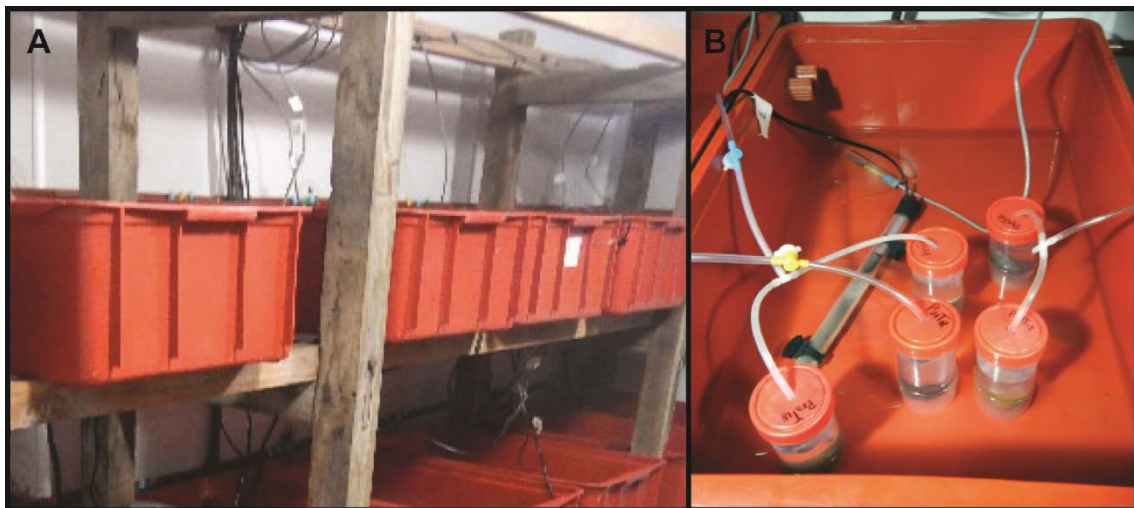


Figura 23. A- Contenedores de agua corriente en la cámara de temperatura controlada. B- Frascos con aireación inmersos en contenedor. Fotografías: Verena Bökenhans.

El efecto de la temperatura sobre el tiempo de desarrollo y el tamaño de la protoconcha embrionaria antes de la eclosión fueron puestos a prueba mediante ANOVAs de un factor, respectivamente.

En cada caso, se comprobó que las muestras cumplan con el supuesto de normalidad mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante una prueba C de Cochran. El ANOVA es un test robusto ante la falta de normalidad cuando: el diseño se encuentra balanceado, el número de muestras para cada tratamiento es mayor a 6 y cuando hay menos a 5 tratamientos (Underwood 1997). Todas estas

condiciones se cumplieron en el presente experimento pudiendo continuar con el análisis en caso que no se cumpliera el supuesto de normalidad. En el largo de la protoconcha embrionaria se realizó la transformación  $x^2$  de modo de cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas del test ANOVA. Se realizaron comparaciones a posteriori a través de la prueba Tukey HSD.

## Resultados

### 1. Masas ovígeras

#### Descripción de la puesta

La masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata* se caracterizó por presentar una forma cilíndrica cuyo diámetro promedio y desvío estándar es  $1,45 \pm 0,52$  cm, largo promedio es  $7,98 \pm 2,25$  cm y peso promedio es  $5,39 \pm 2,66$  g ( $X \pm DS$ ). Las masas ovígeras analizadas (N = 68) presentaron una gran variabilidad, que puede evidenciarse en el rango del diámetro, largo y peso (0,64-3,14cm, 4,30-15,40cm y 1,93-12,90g, respectivamente). Parte de esta variabilidad en el tamaño y peso promedio de las masas ovígeras se relacionó con cambios observados a lo largo de los meses del año (Fig. 24).

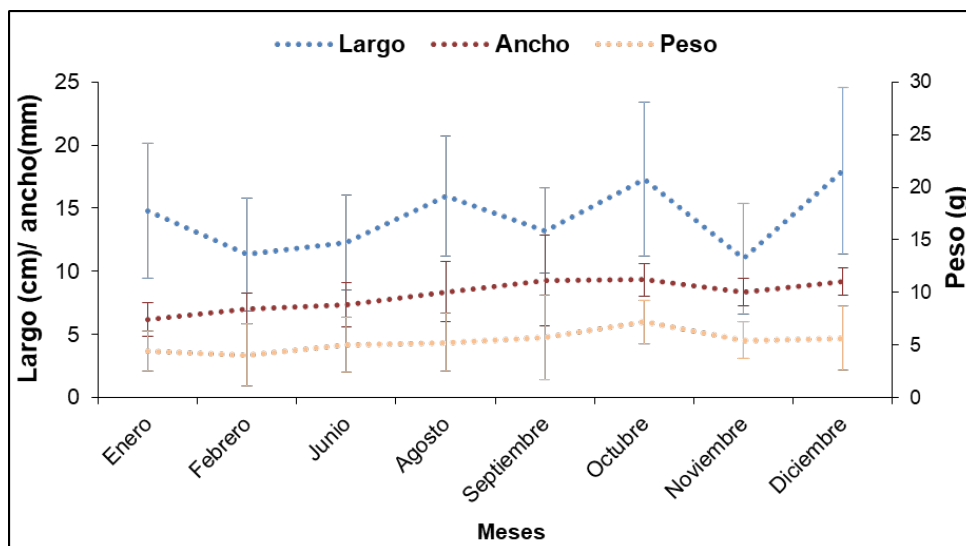


Figura 24. Promedios mensuales de las variables morfológicas de la masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata* para aquellos meses donde se encontraron masas ovígeras en el campo. Período de medición: Octubre 2015-Septiembre 2016.

En el campo, las masas ovígeras se encontraron adheridas en su mayoría a algas y en menor medida sobre sustratos rocosos. En el laboratorio los individuos adhirieron las masas ovígeras a todo sustrato duro disponible, incluyendo las paredes de vidrio de los acuarios, piedras e incluso a las mangueras aireadoras. Habitualmente se encontraron dispuesta de manera semicircular a espiralada o enrollada sobre sí mismas (Fig. 25-A), unidas al sustrato mediante un área estrecha a lo largo de la longitud total de la misma (Fig. 25-B). Esta zona de unión permite una fuerte adhesión al sustrato, presentando una consistencia levemente elástica y altamente resistente, que dificulta la remoción de las masas ovígeras. Los extremos de las mismas difieren morfológicamente entre sí, observándose una forma redondeada correspondiente al extremo donde comienza la oviposición y una forma puntiaguda correspondiente al extremo donde finaliza la misma (Fig. 25-A).

Las masas ovígeras consisten en una matriz gelatinosa transparente (mucus), dentro de la cual se encuentran distribuidas de manera periférica las ovicápsulas que contienen los huevos. En ambos extremos de las masas ovígeras se observaron ovicápsulas vacías (Fig. 25-C). El color de los huevos y embriones le brindó a la masa ovígera su apariencia blanco-amarillento (Fig. 25-D).

Una cubierta externa (Fig. 26-A, Fig. 27-A) contiene la matriz gelatinosa transparente y elástica, que se distribuyó en la totalidad del cilindro. Internamente, las ovicápsulas están dispuestas en estructuras tubulares, cuyos límites muy delgados del tipo membranoso, no siempre son fácilmente visibles bajo el microscopio óptico (Fig. 26-C, Fig. 27-B). Las estructuras tubulares se disponen en forma de anillos cerrados de manera periférica dentro de la matriz gelatinosa, pudiéndose observar en una sección transversal dos anillos concéntricos (Fig. 26-C, Fig. 27). Una cubierta interna separa la zona con ovicápsulas de la gelatina central (Fig. 27).

Al comenzar las eclosiones, el aspecto de la masa ovígera cambió. La misma perdió consistencia, desarmándose fácilmente y se observan zonas donde la cubierta externa se encuentra rota (Fig. 25-E).

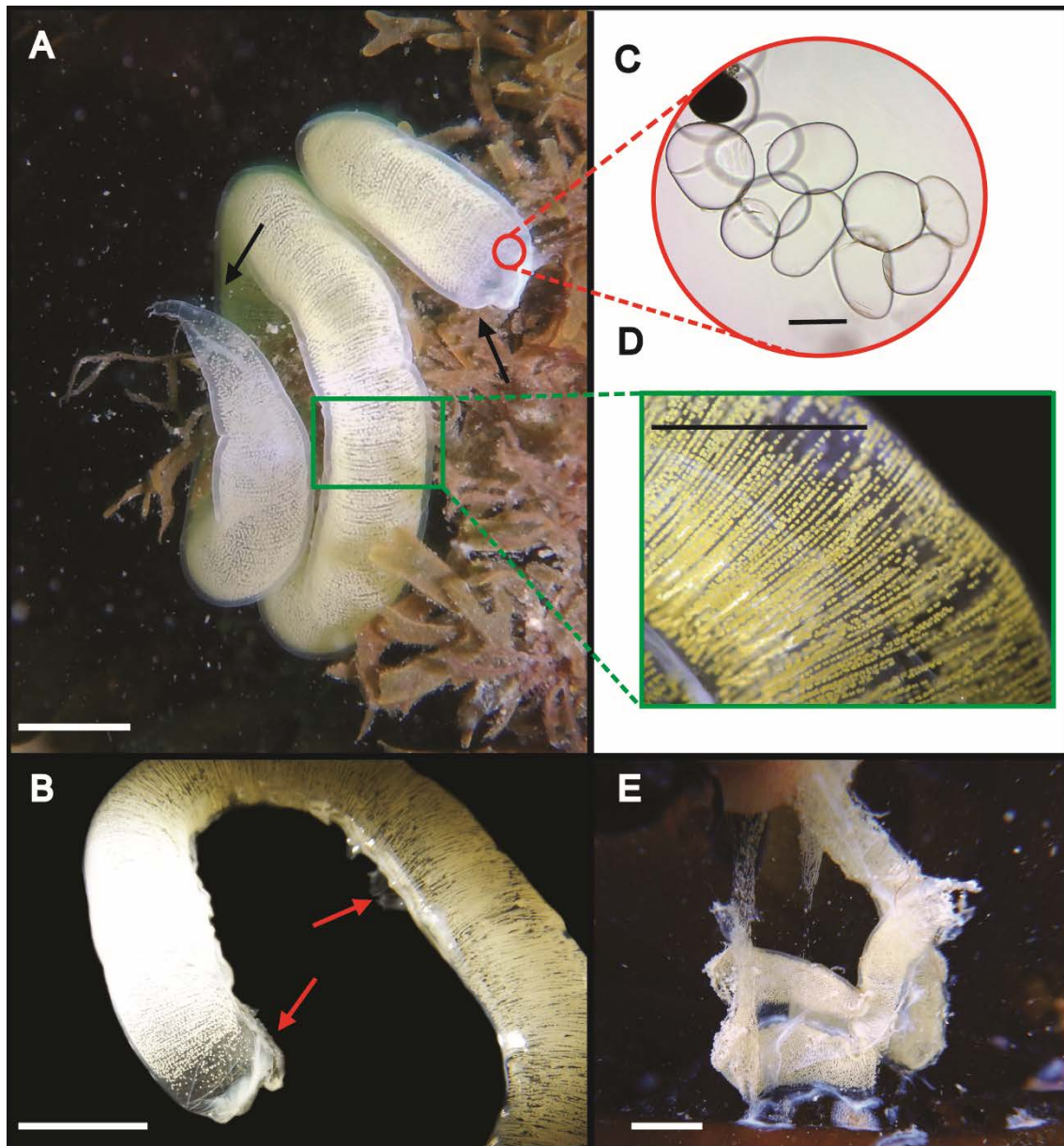


Figura 25. Masas ovígeras de *Pleurobranchaea maculata*. A- Masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata* adherida a un alga. Las flechas indican los diferentes extremos que indican principio y/o fin de la ovisposición. B- Zona de adhesión a lo largo de la longitud total de la masa ovígera (flechas rojas). C- Ambos extremos de la masa ovígera contiene ovicápsulas vacías. D- Estructuras tubulares en forma de anillos dispuestas de manera consecutiva. Embriones de color blanco-amarillento. E- Masa ovígera en estadio de eclosión de las larvas, nótese el estado de deterioro. Escalas: A-C-D-E: 1 cm, B: 100 µm. Fotografías: A, E: Andrés Averbuj, B, C, D: Verena Bökenhans.

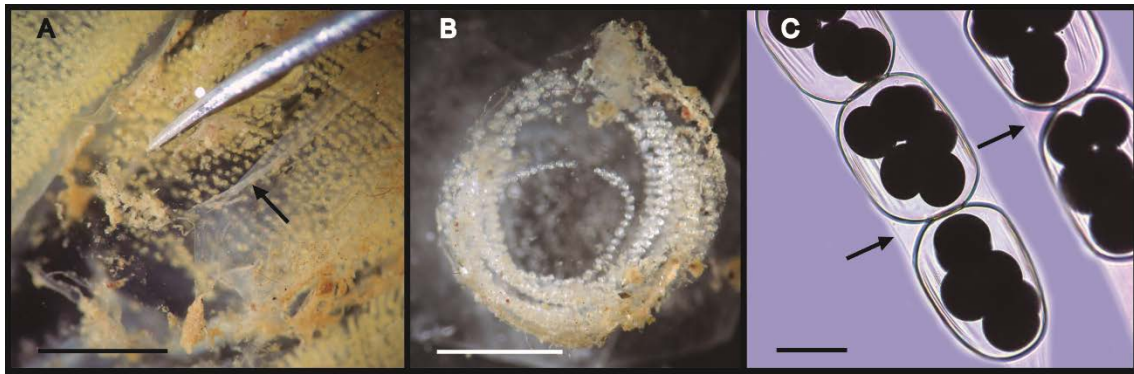


Figura 26. Masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata*. A- Masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata*. La flecha indica la cubierta externa. B- Disposición periférica de las ovicápsulas en forma de anillos. C- Ovicápsulas con embriones dispuestos en doble fila dentro de estructuras tubulares. Las flechas muestra la pared que limita dicha estructura. Escalas: A-B: 0,5 cm, C-: 100  $\mu$ m. Fotografías: Verena Bökenhans.

El tamaño promedio de las ovicápsulas fue 275,13 con un desvío estándar de 37,75  $\mu$ m (N = 1274). Se observó una relación directa entre el diámetro de las ovicápsulas asociados a un mayor número de huevos por cápsula ( $r^2=0,81$ , N=114,  $p < 0,05$ ). Se estimó un promedio de tres embriones por ovicápsula. El máximo de embriones por cápsula observados en las masas ovígeras obtenidas en campo fue de cuatro, mientras que se observaron hasta siete embriones por cápsula en masas ovígeras obtenidas en acuario (N= 3). El número promedio y desvíos estándares de ovicápsulas y embriones estimadas por masas ovígeras (N =10) fue  $58.796,19 \pm 15.904,85$  y  $101.842,07 \pm 39.793,48$  respectivamente.

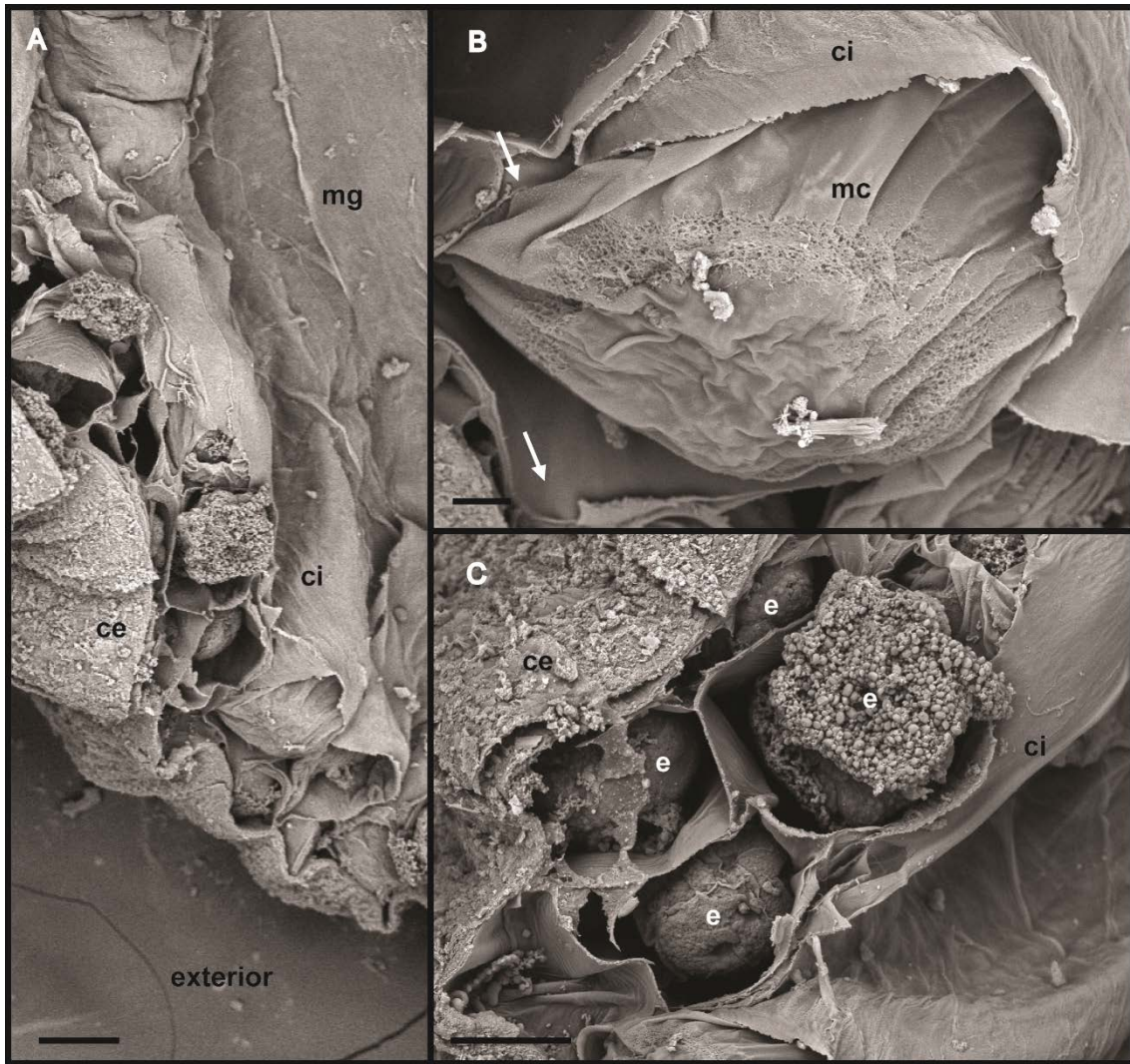


Figura 27. Masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata*. Fotografías MEB. A- Sección periférica de la masa ovígera en un corte longitudinal. Dos filas de ovicápsulas dispuestas de manera paralela entre la cubierta externa y la cubierta interna. B- Ovicápsula dentro de la estructura tubular. Las flechas muestran la pared que mantiene las ovicápsulas en fila. D- Detalle de los embriones en estadio huevo. Abreviaciones: ce: cubierta externa, ci: cubierta interna e: embrión, mc: membrana de la ovicápsula, mg: matriz gelatinosa. Escalas: A: 100  $\mu\text{m}$ , B: 10  $\mu\text{m}$ , C: 50  $\mu\text{m}$ . Fotografías: Mauricio Luquet.

### Estacionalidad reproductiva

*Pleurobranchaea maculata* mostró un marcado período de oviposición, que comenzó con las primeras puestas en julio y extendiéndose hasta febrero. El número máximo de puestas encontradas se observó en enero, coincidente con el máximo de horas de luz, presentando una densidad de  $0,13 \pm 0,10$  puestas/ $\text{m}^2$ . Se observó una disminución en la densidad de puestas encontradas al disminuir el fotoperiodo (Fig. 28).

La disminución de puestas en el campo durante los meses de febrero y marzo, se vio acompañada por una mayor dificultad de encontrar adultos en el campo. En febrero se observaron los primeros juveniles y durante el mes de marzo los individuos adultos de *P. maculata* fueron difíciles de encontrar en el campo. Durante el mes de abril solo se observaron individuos juveniles.

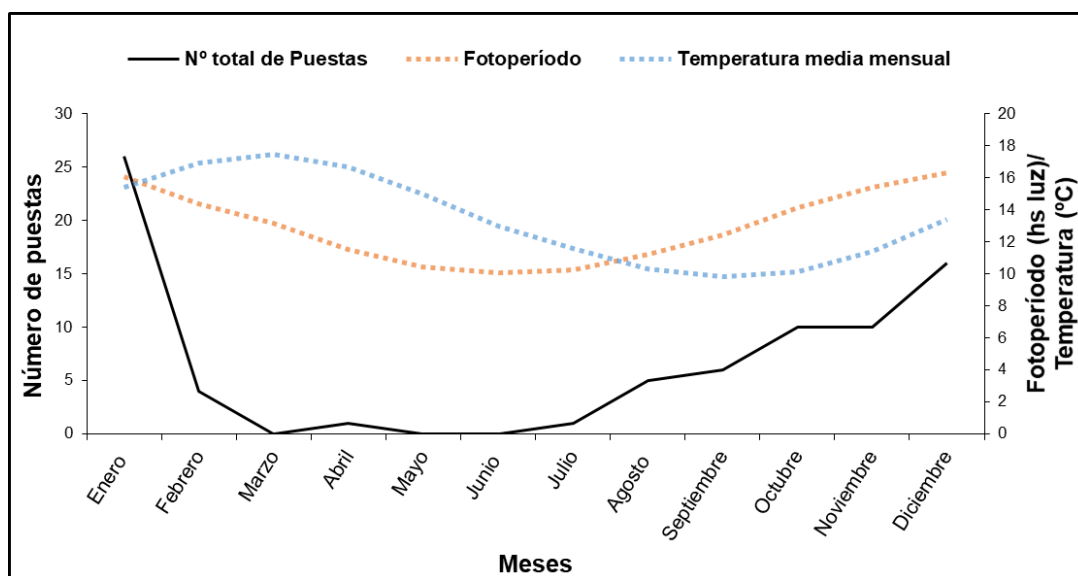


Figura 28. Número de masas ovígeras de *Pleurobranchaea maculata* encontradas en campo a lo largo del año comprendido entre mayo 2018 y abril 2019; se muestran también el fotoperíodo y temperatura del agua de mar para el mismo período.

## 2. Experiencias en acuario: Ensayo de inducción a la oviposición

Durante 47 días de experimento se observó un promedio de  $9,71 \pm 2,75$  masas ovígeras por pareja de cópula ( $X \pm DS$ ). La estacionalidad fue similar a la observada en el campo (Fig. 29), con la mayor oviposición durante el máximo de horas de luz (correspondiente al mes de enero) y ausencia de masas ovígeras durante el mínimo de horas de luz (mayo-junio). Se estimó un promedio mínimo aproximado de cinco masas ovígeras por individuo.

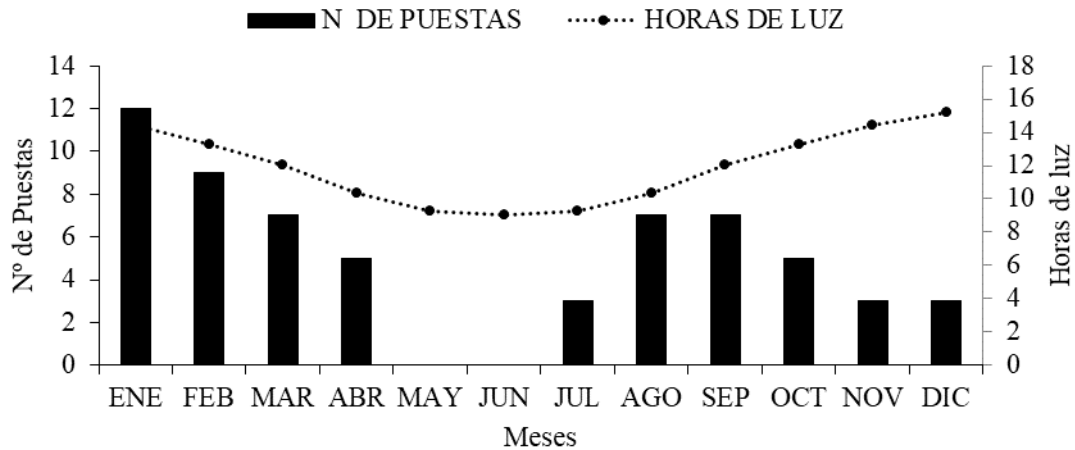


Figura 29. Número de masas ovígeras de *Pleurobranchaea maculata* encontradas durante el ensayo de fotoperiodo en acuarios. Los meses representan el período experimental durante el cual las horas de luz corresponden con los meses del año. Se detalla el fotoperiodo natural para cada mes simulado.

### 3. Desarrollo embrionario

En general, el desarrollo embrionario fue homogéneo a lo largo de la totalidad de la masa ovígera. Sin embargo, se observaron embriones con estadios consecutivos de desarrollo dentro de una misma ovicápsula. La figura 30 muestra una variación en el largo promedio del embrión durante los estadios de su desarrollo intracapsular, en particular aumentando continuamente desde que alcanza el estadio veliger hasta su eclosión.

El diámetro promedio de los huevos sin segmentar y su desvío estándar fue  $116,14 \mu\text{m} \pm 11,70$  (estadio cero -  $N = 407$ ). Los huevos siguieron una segmentación espiral holoblástica. La liberación de los cuerpos polares se observó durante las primeras 24 hs y fue seguida por la primera y segunda división celular, las cuales ocurrieron entre las 24 y 48 hs luego de la oviposición (Fig. 31-A, B). Como consecuencia de la división celular desigual se observa la presencia de macrómeros y micrómeros en las siguientes divisiones celulares seguidos por los estadios mórula y blástula (48 a 96 hs) (Fig. 31-C, D, E). Durante la gastrulación los embriones tomaron forma de corazón y se observa con claridad la zona de invaginación del blastocele (cuarto día) (Fig. 31-F, G). El estadio gástrula se prolongó aproximadamente un día.

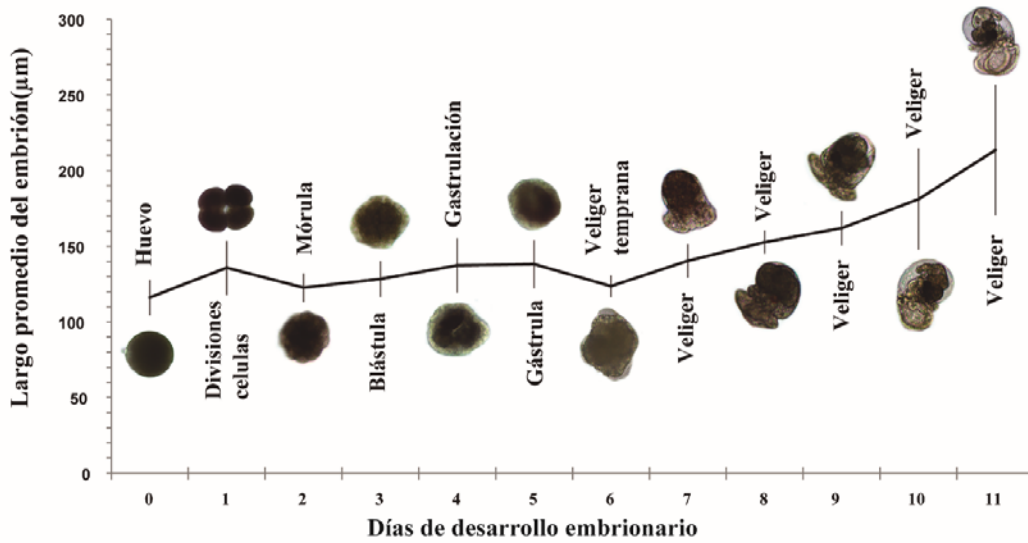


Figura 30. Largo promedio y desvío estándar del embrión de *Pleurobranchaea maculata* a lo largo del tiempo (días). Se detallan los estadios del desarrollo embrionario completo. Fotografías: Verena Bökenhans.

No se observó un estadio equivalente a una larva trocófora en el material estudiado. El estadio veliger temprano fue reconocible a partir del sexto día de desarrollo embrionario. Se caracterizó por la aparición de las primeras cilias, ubicadas en la zona donde rápidamente comienza el crecimiento de los velos incipientes, y posteriormente por la presencia del primordio de una conchilla en forma lenticular (Fig. 31-H). Durante el séptimo día de desarrollo, en el estadio veliger, la protoconcha cubrió la totalidad de la larva masa visceral. Se hicieron reconocibles los estatocistos (Tabla 4), cuyo tamaño se mantuvo prácticamente constante durante todo el desarrollo embrionario (Fig. 31-I). Además, se hizo visible un pequeño pie ciliado.

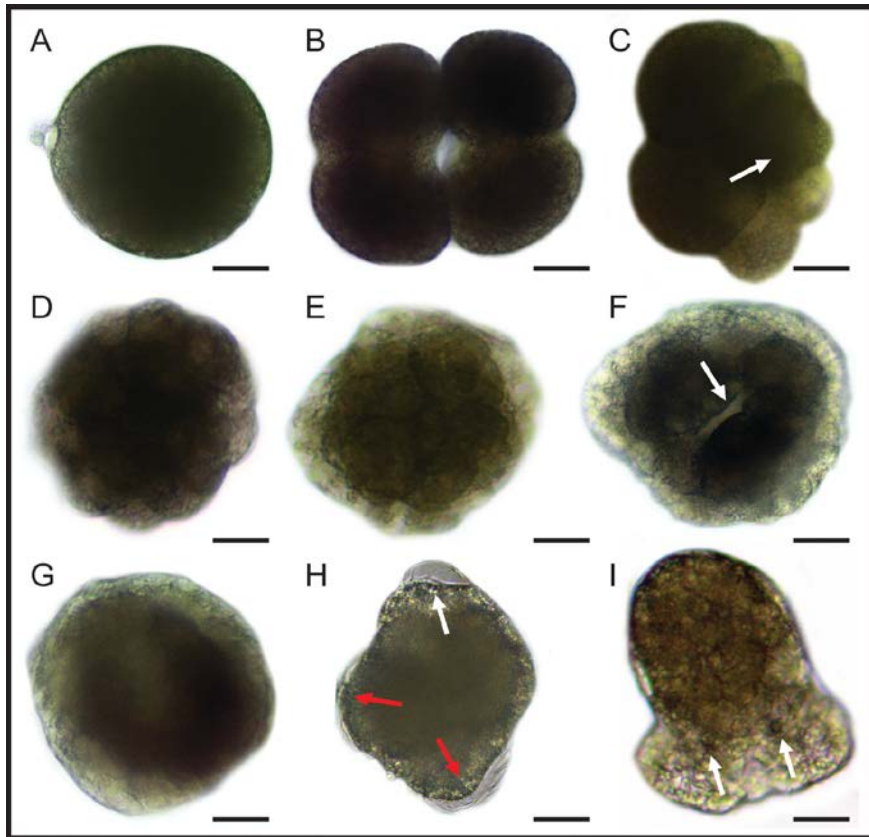


Figura 31. Desarrollo embrionario de *Pleurobranchaea maculata*. A: Huevo. B: Segunda división. C: D: Mórula. E: Blástula. F: Gastrulación: La flecha blanca señala la zona de invaginación del blastocele. G: Gástrula. H: Veliger temprana: Se muestran el velo ciliado en crecimiento (flechas rojas) y el primordio de conchilla lenticular (flecha blanca). I: Veliger. Las flechas señalan los estatocistos. Escalas: 25 µm. Fotografías: Verena Bökenhans.

El estadio veliger se prolongó hasta la eclosión (día 11). Durante el mismo, se observó un incremento en el tamaño del pie, los velos y la protoconcha del embrión (Tabla 4). Esta última es transparente, permitiendo ver fácilmente el desarrollo del sistema digestivo, que durante este estadio consistió en un esófago, estómago, dos glándulas digestivas, ubicadas a cada lado del embrión, y un intestino que se pliega hacia la derecha y desemboca en el ano (Fig. 32). Junto al ano, se observó la glándula anal, como un conjunto de células globulares, y un órgano pigmentado de color rojo (Fig. 32). El músculo retractor se encuentra anclado a la protoconcha del lado izquierdo del embrión (Fig. 32). Las primeras eclosiones se observaron a partir del onceavo día, cuando ocurre la liberación de una gran cantidad de larvas planctotróficas. Durante las eclosiones larvales, un gran número de larvas se liberan de las cápsulas prácticamente de manera simultánea, mientras que otras, permanecen en las ovicápsulas de las masas ovígeras. La

mayoría de las larvas abandonaron las ovicápsulas durante el onceavo día. El doceavo día finaliza el proceso de eclosión.

Tabla 4. Variables morfométricas del estadio embrionario veliger de *Pleurobranchaea maculata*. Los valores expresados representan la media y el desvío estándar para cada estructura embrionaria, siendo N el número total de observaciones.

Estadios / Estructuras embrionarias	Veliger (día 8)( $\mu\text{m}$ )	Veliger (día 9) ( $\mu\text{m}$ )	Veliger (día 10) ( $\mu\text{m}$ )	Veliger (día 11) ( $\mu\text{m}$ )
Largo máximo del embrión	152,73 $\pm$ 7,55 (N=76)	161,99 $\pm$ 11,26 (N=110)	181,15 $\pm$ 33,43 (N=144)	213,57 $\pm$ 43,10 (N=105)
Largo total protoconcha	137,53 $\pm$ 7,70 (N=53)	149,94 $\pm$ 11,78 (N=116)	165,48 $\pm$ 11,84 (N=103)	185,41 $\pm$ 12,23 (N=101)
Ancho protoconcha	102,99 $\pm$ 10,91 (N=158)	106,52 $\pm$ 6,79 (N=63)	109,69 $\pm$ 9,19 (N=110)	113,17 $\pm$ 8,54 (N=39)
Alto protoconcha	113,79 $\pm$ 8,45 (N=82)	119,94 $\pm$ 10,78 (N=129)	124,47 $\pm$ 13,74 (N=136)	134,87 $\pm$ 14,15 (N=92)
Ancho del velo	75,36 $\pm$ 6,18 (N=61)	80,68 $\pm$ 9,83 (N=101)	87,39 $\pm$ 15,94 (N=77)	74,59 $\pm$ 18,85 (N=19)
Alto del velo	83,73 $\pm$ 7,98 (N=90)	88,16 $\pm$ 9,44 (N=99)	99,01 $\pm$ 12,71 (N=104)	117,83 $\pm$ 17,35 (N=100)
Largo del pie	50,09 $\pm$ 7,98 (N=69)	61,07 $\pm$ 7,19 (N=125)	69,07 $\pm$ 7,19 (N=98)	79,66 $\pm$ 18,38 (N=92)
Órgano pigmantado	23,83 $\pm$ 3,24 (N=64)	27,31 $\pm$ 3,17 (N=101)	29,39 $\pm$ 3,83 (N=110)	30,25 $\pm$ 4,56 (N=88)
Estatocistos	11,77 $\pm$ 8,99 (N=60)	10,61 $\pm$ 1,67 (N=75)	11,26 $\pm$ 1,81 (N=63)	10,96 $\pm$ 1,97 (N=63)

Al momento de la eclosión (veliger-día 11) el largo total promedio de la protoconcha y su desvío estándar fue 185,41  $\pm$  12,23  $\mu\text{m}$  (N = 101). Cada lóbulo velar presentó dos hileras de cilias (Fig. 323) y un tamaño de 74,59  $\pm$  18,85  $\mu\text{m}$  de ancho (N = 76) y 117,83  $\pm$  17,35  $\mu\text{m}$  de alto (X  $\pm$  DS, N = 100). Los estatocistos se encontraron ubicados a la altura de la zona anterior del pie, que en esta etapa era ciliado. El pie carece de opérculo

durante todo su desarrollo y alcanzó un largo promedio y desvío estándar de  $79,66 \pm 18,38$   $\mu\text{m}$  previo a la eclosión. No se observaron ojos durante todo el desarrollo intracapsular.

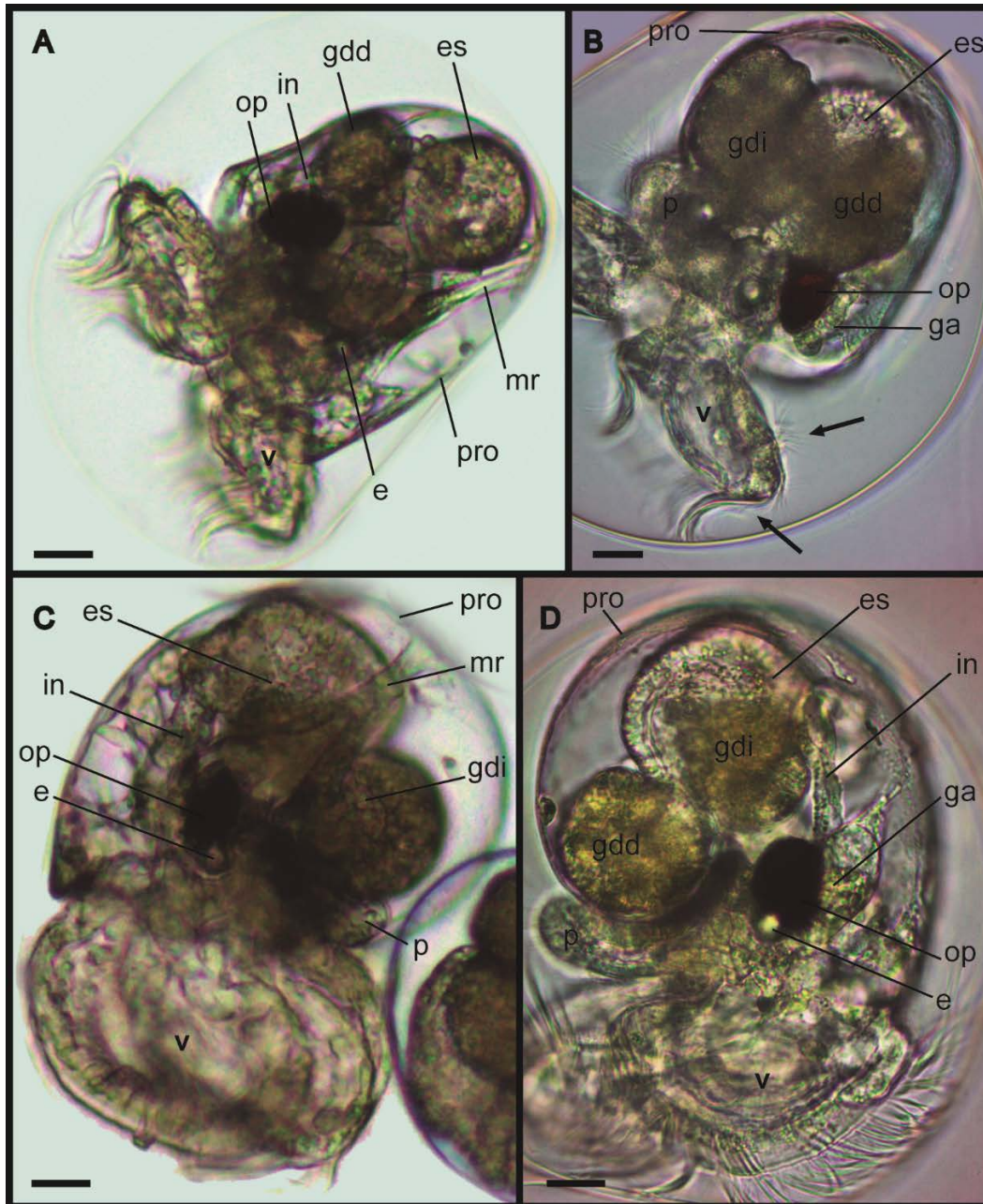


Figura 32. Embriones en estadio pediveliger de *Pleurobranchaea maculata*. A-Vista frontal de pediveliger día 9. B- Vista dorsal de pediveliger día 9. Lóbulo velar con dos hileras de cilias (flechas) C- Lado izquierdo del embrión pediveliger día 11, con músculo retractor anclado a la protoconcha. D- Lado derecho del embrión pediveliger día 11, con órganos internos bien desarrollados. Los estatocistos se observan en la región anterior del pie ciliado. Abreviaciones: e: estatocistos, es: estómago, ga: glándula anal, gdd: glándula digestiva derecha, gdi: glándula digestiva izquierda, in: intestino, mr: músculo retractor, p: pie, pro: protoconcha, v: velo. Escalas: 20  $\mu\text{m}$ . Fotografías: Verena Bökenhans.

#### 4. Experiencia en acuario: Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario

Las masas de huevos expuestas a temperaturas extremadamente bajas y altas (5 y 22 °C) no completaron el desarrollo embrionario y fueron excluidos de los análisis estadísticos. A una temperatura de 5 °C no se observó desarrollo de los embriones. Entre el tercer y el sexto día, los huevos se aglomeraron, se desintegraron en fragmentos más pequeños o se observó una capa de aspecto oleosos en su periferia, momento en el cual la masa del huevo se retiró del experimento. A una temperatura de 22 °C se observaron sucesivas divisiones celulares durante el primer día. A partir del segundo día los huevos se desintegraron en fragmentos más pequeños. En raras ocasiones se observaron embriones más avanzados (con presencia de algunas cílios aisladas o protoconchas anormales), pero con deformaciones y claramente inviábiles.

Se encontraron diferencias significativas en los tiempos de desarrollo a diferentes temperaturas (10, 14 y 18 °C) (ANOVA:  $F_{2,23} = 96,29$ ;  $p < 0,01$ ). Los resultados del análisis demuestran que al exponer las masas ovígeras de *P. maculata* a una temperatura de 10°C, las mismas presentaron un mayor tiempo de desarrollo que las masas expuestas a temperaturas de 18°C (Tabla 5). El tiempo medio y desvío estándar de desarrollo embrionario para los embriones expuestos a 10 °C fue  $14,37 \pm 0,48$  días, mientras que para los expuestos a 14 y 18 °C fue de  $10,12 \pm 0,92$  días y  $7,50 \pm 0,5$  días, respectivamente.

Tabla 5. Tiempo (días) en completar el desarrollo embrionario, para cada masa ovígera a diferentes temperaturas.

Temperatura	Puesta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T <sub>18</sub>	7	8	8	7	7	7	8	8
T <sub>14</sub>	9	10	10	9	10	11	12	10
T <sub>10</sub>	14	14	15	15	14	14	15	14

La longitud media total de la protoconcha embrionaria antes de la eclosión y su desvío estándar fue  $199,1 \pm 11,8 \mu\text{m}$  a 10 °C,  $209,9 \pm 11,6 \mu\text{m}$  a 14 °C y  $217,2 \pm 11,6 \mu\text{m}$  a 18 °C. Las temperaturas experimentales del agua de mar también demostraron tener un efecto sobre el largo de la protoconcha embrionaria de las masas ovígeras de *P. maculata*

(ANOVA:  $F_{2,21} = 4,4$ ;  $p < 0,01$ ). La temperatura de 18 °C presentó un mayor efecto sobre el largo de protoconcha embrionaria que al exponerlas a una temperatura de 10°C.

## Discusión

La forma cilíndrica enrollada sobre si misma característica de las masas ovígeras de *Pleurobranchaea maculata*, así como las estructuras y distribución de las ovícapsulas son similares a las descritas para *Pleurobranchaea japonica* (Tsubokawa y Okutani 1991), difiriendo de las masas ovígeras encontradas en otras especies perteneciente a la Superfamilia Pleurobranchoidae (Hurst 1967, Gibson 2003). La distribución de las ovicápsulas dentro de las masas ovígeras podría ser el resultado de respuestas adaptativas para diferentes fuentes de estrés ambiental (Rawlings 1990, Przeslawski 2004). En particular, el ambiente submareal suele ser estable en cuanto a cambios repentinos de salinidad y temperatura, resultando más severo en cuanto a la disponibilidad de oxígeno (Strathmann 1977, Strathmann y Strathmann 1995, Przeslawski 2004, Przeslawski y Davis 2007, Woods y Moran 2008, Moran y Woods 2010). Las paredes de las ovicápsulas limitan la difusión de oxígeno (Cancino et al. 2000, Brante 2006) y, a su vez, las condiciones intracapsulares de oxígeno afectan el desarrollo intracapsular. Por ello, el tipo de empaquetamiento de los embriones dentro de las masas ovígeras gelatinosas es fundamental para garantizar el correcto suministro de oxígeno a los embriones (Fernández et al. 2007), limitando el tamaño de las masas ovígeras (Cancino et al. 2003, Fernández et al. 2007) y en consecuencia el número de embriones por puesta (Perron y Corpuz 1982, Fernández et al. 2007). La distribución periférica de las ovicápsulas en las masas ovígeras de *P. maculata* podría representar una ventaja adaptativa, de modo de garantizar la difusión de oxígeno desde el exterior a los embriones en desarrollo. Así, posibilita además masas ovígeras de mayor tamaño y en consecuencia mayor número de embriones por puesta.

El número de huevos/embriones por masa ovígera estimados en el presente trabajo para *P. maculata* (101.842,07) se encuentra por debajo del medio millón de huevos registrados para *P. japonica* por Tsubokawa y Okutani (1991). En dicho trabajo, el largo promedio de las masas ovígeras de *P. japonica* fue alrededor de cinco veces mayor al estimados para *P. maculata* y el promedio de huevos por ovicápsula fue más del doble

que el encontrado en *P. maculata*. En los opistobranquios se observa una correlación positiva entre el tamaño del progenitor con el número de huevos por masa ovígera, así como con el número de huevos por ovicápsulas (Thompson 1967, Harrigan y Alkon 1978, Domènec Ros 1981). El peso máximo de los individuos de *P. maculata* encontrados en el sitio Punta Este nunca superaron los 34 gr, mientras que para *P. japonica* se han reportado individuos de entre 30 y 80 gr (Chiken et al. 2009). De modo que la diferencia de huevos por ovicápsula y por masa ovígera encontrados entre las especies posiblemente se deba, en parte, a las diferentes tallas que alcanzan los individuos en cada sitio.

El inicio de la temporada de oviposición en *P. maculata* coincide con lo descrito por Olive (1995) para otras especies semélparas, donde el fotoperiodo es el responsable de desencadenar los procesos endógenos que inducen la misma. Los individuos de *P. maculata* que habitan el Golfo Nuevo inician el período de oviposición en julio (invierno), coincidente con un aumento en las horas de luz, sugiriendo una influencia directa del fotoperiodo en el comienzo de la oviposición en esta especie. A su vez, la cantidad de horas de luz pareciera influir en la frecuencia de oviposición a lo largo del año en *P. maculata*. Tanto el número de masas ovígeras encontradas en el campo como las ovipuestas por individuo en cautiverio se incrementó de manera coincidente con un aumento en las horas de luz, encontrándose el máximo de puestas en enero (verano), cuando las horas de luz alcanzan su máximo. El aumento en la frecuencia de oviposición en respuesta a un aumento en el fotoperiodo ha sido descritos para el gasterópodo murícido *Trophon geversianus* (Cumplido et al. 2010) y el volútido *Odontocymbiola magellanica* (Bigatti et al. 2008), ambos habitantes de Golfo Nuevo donde habita la población estudiada de *P. maculata*. Por el contrario, en las costas de California (EE.UU.), la liebre de mar *Aplysia californica* (Opisthobranchia) presentó una mayor frecuencia de oviposición al ser expuesta a días cortos (8 de horas luz) en relación a días largos (16 horas de luz) (Wayne y Block 1992). Sin embargo, a diferencia de *P. maculata* el período de oviposición reportado para *A. californica* comienza en verano prolongándose durante el otoño, contrario a lo observado en *P. maculata*.

En términos generales el ensayo de inducción a la oviposición en el acuario replica la estacionalidad de puesta observada en el campo. Sin embargo, en dicho ensayo se observó una disminución en la frecuencia de masas ovígeras en los días correspondientes a los meses de noviembre y diciembre. La misma posiblemente se encuentre relacionada a la variación constante del fotoperiodo lo largo del experimento en contraposición con la

variación sigmoideal natural del mismo, produciendo que esos meses queden representados por menos cantidad de días. A su vez, el presente ensayo refleja que un individuo puede poner al menos 5 puestas en un ciclo de luz anual. El corto tiempo experimental posiblemente no sea suficiente para que los individuos puedan recuperarse energética y fisiológicamente por lo que sería esperable que dicha estimación subestime la capacidad reproductiva de la especie en condiciones naturales. De todos modos, se puede afirmar que *P. maculata* produce, al menos, más de medio millones de embriones por individuo durante un año. La alta fecundidad que presenta *P. maculata* estaría relacionada con la estrategia de desarrollo con presencia de larvas plantotróficas, las cuales se ven sometidas a la depredación y competencia por el alimento (Vance 1973, Underwood 1974). Por todo ello no sorprende que la inversión energética en el adulto esté orientada a la producción de un gran número de huevos (Llodra 2002).

Parece poco probable que la temperatura presente un efecto sobre el período de oviposición en *P. maculata*. Sin embargo, durante febrero y marzo, cuando el agua alcanza su máximo de temperatura, se observa en el campo una disminución abrupta del número de puestas. Esta reducción, sin embargo, se ve acompañada de la desaparición de individuos adultos y de la aparición de individuos juveniles (Capítulo I), sugiriendo mortalidad post-reproductiva de los adultos (Todd y Doyle 1981, Todd 1983). De este modo, la temperatura podría estar influyendo sobre otras etapas del ciclo de vida de *P. maculata*, por ejemplo incidiendo en la tasas de supervivencia larval (Pérez-Valdés y Contreras-Guzmán 2016), presentando un efecto en el desarrollo gonadal (Olive 1995, Llodra 2002) o interviniendo en procesos que desencadenen su senescencia. Estudios adicionales son necesarios para comprender en mayor detalle el efecto de la temperatura en el ciclo de vida de *P. maculata*.

Las características morfológicas embrionarias descritas para *P. maculata* coinciden con lo reportado previamente para la misma especie en Nueva Zelanda (Gibson 2003). Las características más destacadas del desarrollo embrionario es la ausencia de opérculo a lo largo de todo el desarrollo, representando una característica apomórfica de la Superfamilia Pleurobranchoidae (Tsubokawa y Okutani 1991, Gibson 2003, LaForge y Page 2007). Sin embargo, los tiempos de desarrollo embrionario de *P. maculata* difieren entre ambas regiones geográficas, completándose en 11 días en Argentina y en 8 días en Nueva Zelanda (Gibson 2003), a pesar de haber sido estimados a partir de masa ovígeras mantenidas a 14 °C en laboratorio para ambos casos. Numerosos factores ambientales

pueden condicionar el tiempo de desarrollo embrionario en la misma especie que habita diferentes regiones geográficas (Przeslawski 2004), siendo la temperatura del sitio donde habita uno de los factores más importantes (Spight 1975, Palmer 1994). La temperatura promedio mensual del agua de Nueva Zelanda (Auckland) es superior a la que se encuentra en el sitio de estudio (Punta Este), variando entre 14 y 20°C en Nueva Zelanda y entre 11 y 18 °C en Argentina ([www. seatemperature.info](http://www.seatemperature.info)). Debido a que el efecto de la variación de la temperatura en el tiempo de desarrollo embrionario depende de la temperatura del sitio de origen que habitan los individuos (Fernández et al. 2007), el aumento en el tiempo de desarrollo intracapsular observado en *P. maculata* podría ser el resultado a respuestas adaptativas al encontrarse en un nuevo ambiente con menor temperatura media (Moran y Alexander 2014).

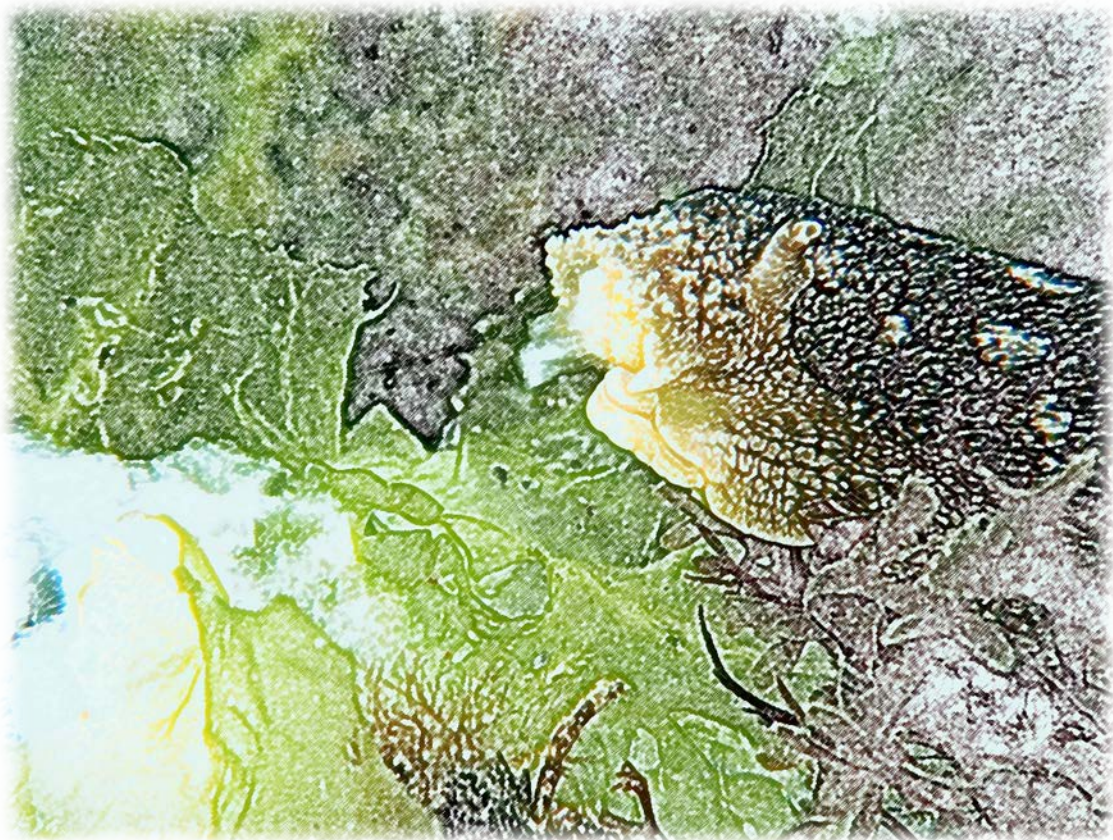
El desarrollo embrionario de *P. maculata* resulta ser exitoso dentro de un rango térmico similar al del agua de mar a lo largo del año en el sitio de estudio (10 a 18 °C). De este modo, el tiempo del desarrollo embrionario y las tallas al eclosionar variarán a lo largo del año, acorde a las variaciones observadas en esta Tesis. Las primeras masas ovígeras encontradas a partir de julio, desarrollaran más lento y a menores tallas que aquellas encontradas hacia el final del período de oviposición. El aumento en la tasa de crecimiento durante el desarrollo embrionario hacia el final del período de oviposición, podría resultar ventajoso si el organismo que eclosiona encuentra alimento y crece más rápido (Uriarte et al. 2012). De este modo las larvas que eclosionan a mayores temperaturas, hacia el final del período de oviposición, presentarían una mayor tasa de crecimiento (O'Connor et al. 2007). De este modo podrían compensar menores tasas de crecimiento de las larvas que eclosionan a menores temperaturas, las cuales necesitarán períodos más largos de crecimiento para alcanzar tallas similares antes de la metamorfosis (Watt y Aiken 2003). Por otro lado, menores tasas de crecimiento de las larvas planctotróficas (hacia el inicio del período de oviposición), aumentarían los tiempos de desarrollo larvales pudiendo aumentar el potencial de dispersión (Pechenik 1984, O'Connor et al. 2007, Pappalardo y Fernández 2014).

Los estudios de tolerancia térmica durante el desarrollo embrionario podrían contribuir a comprender el potencial rango de distribución geográfica que las especies podrían alcanzar (Golikov y Scarlato 1973, Thompson et al. 2017). *P. maculata* no completa el desarrollo embrionario durante ambas temperaturas extremas (22 y 5 °C), lo que indicaría que éstas se encuentran por fuera del límite de tolerancia térmica. El límite supraóptimo

de desarrollo embrionario se encontraría por encima de los 18 °C. En Mar del Plata (Buenos Aires), donde la especie ya se encuentra establecida, las temperaturas máximas promedio registradas se encuentran entre los 18 y los 22 °C. Posiblemente los individuos de *P. maculata* que habitan las aguas de Mar del Plata presenten diferente tolerancia térmica en el desarrollo embrionario. La variación en el límite supraóptimo de tolerancia térmica entre poblaciones de la misma especie que habita diferentes lugares geográficos podría deberse a diferencias genéticas entre poblaciones o a diferentes respuestas ambientales (Fernández et al. 2007). Por otro lado, el límite subóptimo de desarrollo embrionario se encontraría por debajo de los 10 °C, por lo que la especie podría encontrar un límite en su distribución austral. Desde 2009, *P. maculata* se ha expandido desde las costas de Mar del Plata (Farias et al. 2015) hasta Bahía Camarones (Battini et al. 2019), donde las temperaturas medias mensuales del agua alcanzan su máximo de 15 °C en febrero y su mínimo de 9 °C en julio. El mismo rango térmico se mantiene a lo largo del Golfo San Jorge hasta el norte de la provincia de Santa Cruz (Caleta Olivia). Varios factores pueden condicionar la expansión del rango de distribución de las especies, tales como competencia, depredación, disponibilidad de alimento, salinidad, entre otros (Battini et al. 2019). Sin embargo, según las condiciones térmicas, los resultados sugieren que *P. maculata* podría presentar un desarrollo embrionario exitoso a lo largo del Golfo San Jorge, pudiendo ampliar su rango de distribución al menos hasta Caleta Olivia.

Se puede concluir, por lo tanto que *P. maculata* presenta una marcada influencia del fotoperiodo sobre el inicio del período de oviposición así como en la frecuencia oviposición de masas ovígeras. La producción de un alto número de embriones anuales registrados con fase dispersiva facilitaría la colonización de nuevos hábitats, favoreciendo que *P. maculata* continúe ampliando su rango de distribución a lo largo de la costa Argentina, al menos mientras encuentre condiciones físico-ambientales y nutricionales adecuadas. Por ello sería conveniente aumentar el esfuerzo de monitoreo en las áreas con potencialidad a ser invadidas de modo de tener una detección temprana de la especie (Schwindt y Bortolus 2017).

**CAPÍTULO III:**  
**DIETA**  
**Y**  
**ECOLOGÍA TRÓFICA**



*Datos obtenidos como resultados de este capítulo fueron publicados como:*

Bökenhans V, Fernández Alfaya JE, Bigatti G, Averbuj A. 2019. Diet of the invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* in Patagonian coastal waters. *New Zealand Journal of Zoology*. 46(1):87-94.

## Introducción

La introducción de especies exóticas causa graves daños a la biodiversidad (Carlton 1996, Olden et al. 2004, Mendez et al. 2015). A menudo las especies invasoras son generalistas, en términos de dieta o tolerancias ambientales, lo cual facilita su propagación (Kolar y Lodge 2001, Olden et al. 2004). Una vez establecida, la presencia de una nueva especie con hábito consumidor generalista puede tener implicaciones importantes, y muchas veces perjudiciales, para los ecosistemas invadidos (Layman y Allgeier 2012); entre ellas, puede producir cambios en la abundancia de los organismos de las comunidades nativas (Grosholz et al. 2000). Para conocer los efectos directos de los depredadores introducidos es necesario conocer las relaciones tróficas entre éstas y las especies nativas (Layman y Allgeier 2012).

Los estudios de las composiciones dietarias mediante técnicas directas, tales como el análisis de los contenidos estomacales, regurgitaciones, materia fecal y observaciones *in situ*, aportan información sobre la diversidad de recursos utilizados, así como una estimación de la importancia relativa de las especies consumidas (Hyslop 1980). Sin embargo, el modo de alimentación, tales como la masticación de los alimentos, pueden dificultar la identificación taxonómica y la estimación de la cantidad real de los ítems presas (Hyslop 1980). A su vez, la identificación de las presas podría estar limitada debido a las diferencias en las tasas de digestión de los distintos grupos ingeridos (Hyslop 1980, Duffy y Jackson 1986). Por otro lado, las especies del género *Pleurobranchaea* presentan un aparato bucal complejo (Morse 1984, McClellan 1982) que cuenta con una rádula ubicada en su base y un par de mandíbulas ubicada a los lados (McClellan 1982). Ambas estructuras están provistas de numerosos dientes para agarrar las presas, cuyas formas son específicas. La acción combinada de ambas estructuras promueve un comportamiento que permite identificar sencillamente aquellos animales que se encuentran alimentándose, facilitando los estudios dietarios mediante métodos directos (Morse 1984).

Complementariamente, los análisis de isótopos estables de tejidos animales han demostrado ser una herramienta útil para reconstruir dietas, caracterizar relaciones tróficas y dilucidar patrones de uso de recursos tróficos por parte de los organismos (Boecklen et al. 2011), ayudando a superar algunas de las dificultades asociadas al uso de métodos directos (Zabala et al. 2013, Gatto y Yorio 2016). Este análisis se basa en las diferencias en la composición de isótopos estables de carbono y nitrógeno ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ )

entre los tejidos de los consumidores y sus recursos alimentarios (Abrantes et al. 2014). En términos generales,  $\delta^{13}\text{C}$  se usa como indicador del uso de los hábitos alimenticios de un organismo (DeNiro y Epstein 1978), mientras que las  $\delta^{15}\text{N}$  se usa principalmente para calcular las posiciones tróficas relativas (es decir, niveles tróficos) de los consumidores a la red alimentaria (Post 2002). Sin embargo, cuando se analizan las  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de manera combinada pueden proporcionar información detallada sobre la dieta de un organismo (Zanden y Rasmussen 2001). Mediante el análisis de modelos de mezcla bayesianos de isótopos estables se puede evaluar la proporción relativa de las diferentes presas consumidas por un depredador en función de los valores isotópicos de los tejidos del depredador y de sus presas (Moore y Semmens 2008, Parnell et al. 2010). A su vez, los análisis isotópicos brindan información de los nichos isotópicos y su solapamiento (Abrantes et al. 2014). El nicho isotópico es un espacio multidimensional, representado por los ejes  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ , que brinda información de los recursos que los organismos utilizan y del hábitat en que se encuentran (Newsome et al. 2007).

Las especies del género *Pleurobranchaea* habitan ambientes submareales, en aguas tropicales o templadas (Willan 1984), que ocupan desde las zonas del intermareal poco profundas hasta los 150 m de profundidad (Muniain et al. 2007). Se espera que el uso de recursos de los individuos que habitan diferentes profundidades se vea reflejado en diferencias en cuanto a sus nichos isotópicos, particularmente en cuanto a las proporciones de isótopos de carbono. Esto se debe a que en un sistema marino los productores primarios (fitoplancton y algas) presentan valores diferentes de  $\delta^{13}\text{C}$ . Las algas bentónicas a menudo muestran valores más altos de  $\delta^{13}\text{C}$  que las algas planctónicas (France 1995). Por ello las proporciones de isótopos de carbono de los consumidores pueden ser útiles para determinar diferencias entre organismos que hacen uso de recursos de una trama trófica bentónicos o pelágicos.

La información previa sobre las dietas de algunas especies del género *Pleurobranchaea* ha sido estudiada principalmente en contenidos estomacales u observaciones en acuarios. *P. meckelii*, habitante de las costas noreste de Italia, fue reportada como una especie carnívora oportunista con una preferencia dietaria sobre los cnidarios (Cattaneo-Vietti et al. 1993). Sin embargo, en algunas especies (*P. meckelii*, *P. californica*, *P. japonica*) se observó también canibalismo de los adultos sobre los juveniles en estado natural (Willan 1984, Tsubokawa y Okutani 1991, Cattaneo-Vietti et al. 1993, Battle y Nybakken 1998).

En particular, *Pleurobranchaea maculata* ha sido descrita como una carnívora voraz (Ottaway 1977) que puede vivir en acuarios en base a una dieta exclusiva de actinarios (Willan 1984). En su hábitat nativo, algunos componentes dietarios de la especie fueron descritas utilizando técnicas indirectas. Mediante análisis de secuenciaciones genéticas de los contenidos estomacales se reportó que *P. maculata* incorpora a su dieta cnidarios, en su mayoría hidrozooos, y poliquetos sedentarios perteneciente al género *Thelepus* (Salvitti et al. 2017), así como también varias especies de bivalvos de la familia Mytilidae (Taylor et al. 2015). A su vez, se reportaron que los nichos isotópicos ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) de la especie son relativamente similares a la de algunas especies carroñeras de la zona (Taylor et al. 2015), sugiriendo que podrían hacer uso de estos recursos. Sin embargo, nada se conoce acerca de la dieta de *P. maculata* que habitan las aguas del Golfo Nuevo.

Los estudios dietarios de *P. maculata* en su nuevo hábitat son de fundamental importancia para evaluar los efectos directos que la presencia de este depredador puede presentar en el ecosistema. A su vez, brindan información ecológica importante para la elaboración un adecuado programa de monitoreo y manejo de la especie introducida.

En este capítulo se describirá la dieta de *Pleurobranchaea maculata* mediante observaciones de alimentación *in situ* y estudios de contenido estomacal y se estudiará la ecología trófica de la especie mediante el análisis de isótopos estables de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ .

## **Materiales y métodos**

### **1. Estudio de dieta mediante métodos directos**

#### Determinación del contenido estomacal

Para el estudio de la dieta de *Pleurobranchaea maculata* en su nuevo hábitat en los golfos norpatagónicos se recolectaron un total de 102 individuos durante el mes de enero 2017 de dos sitios de muestreo: 61 individuos en Punta Este (PE) y 41 individuos en el naufragio Folias (Fo). Los ejemplares fueron mantenidos en frío y transportados en bolsas aisladas hasta el laboratorio, donde fueron inmediatamente diseccionados y sus contenidos estomacales fijados en formol al 10% en agua de mar.

El contenido estomacal de cada individuo fue observado bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico. La identificación taxonómica se realizó a partir de todo material cuyo

estado permitiera observar estructuras reconocibles, hasta el menor nivel taxonómico posible. Para la identificación taxonómica se consultó la bibliografía disponible (Knox 1951, Bartholomew 2001, Valdés y Muniain (2002), da Rocha et al. 2005, Piriz 2009, Häussermann y Försterra 2009, Rocha et al. 2012, Paiva et al. 2015) y en caso de ser necesario se consultó a especialistas de ciertos grupos taxonómicos: Paula Raffo y Gabriela Casas (Algas), Maria Emilia Diez (Poliquetos), Javier Signorelli (Bivalvos), José Elías Fernández Alfaya (Nemertinos), Virgínia Lo Russo (Nematodos) y Luján Villanueva Gomila (ovicápsulas de osteíctios). Cuando fue necesario, se tiñeron las muestras con Rosa de Bengala (10% en agua) para una mejor identificación de las presas. En el caso de las especies de gasterópodos se extrajo la rádula y se observó bajo microscopio óptico.

Se calculó la frecuencia de ocurrencia de cada ítem presa, como la cantidad de individuos de *P. maculata* analizados que contienen cada ítem presa en su estómago. Siguiendo a Costello (1990), se calculó el porcentaje de ocurrencia (O%) de cada ítem presa, definido como el porcentaje que un determinado ítem presa representa del número total de ítems presas encontrados, para cada sitio. Para establecer si existen diferencias en cuanto a las presas consumidas entre sitios de muestreo los resultados fueron analizados mediante tablas de contingencia utilizando el estadístico Chi-cuadrado, con un nivel de significancia del 5%. A su vez, debido al alto porcentaje de algas observadas en los estómagos, se compararon la proporción de ingesta de algas y animales de la paridad (1:1) para cada sitio de muestreo.

#### Observación de eventos de alimentación *in situ*

Complementariamente, se registraron *in situ* todos los eventos de alimentación de *Pleurobranchaea maculata* mediante buceos diurnos en el sitio de muestreo PE. Durante dos años de observaciones mensuales (2015-2016, 2018-2019) y un año de observaciones estacionales (primavera 2016, verano 2017, otoño 2017 e invierno 2017) se registraron e identificaron las presas, completando un total de aproximadamente 60 horas de buceo. Los eventos de alimentación registrados fueron aquellos en los que los individuos presentan el velo oral posicionado hacia arriba y el aparato bucal extendido hacia afuera sujetando la presa. Las presas fueron identificadas posteriormente mediante el registro

fotográfico y cuando fue necesario fueron recolectadas y llevadas al laboratorio para su posterior identificación.

## **2. Estudio de dieta mediante métodos indirectos**

### Análisis de isótopos estables de $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$

Durante el mes de enero de 2018 se recolectaron 20 individuos de *Pleurobranchaea maculata* y sus presas mediante buceo autónomo en la zona costera de PE. Los muestreos se realizaron en un período corto de tiempo (durante menos de una semana) de modo de evitar la variabilidad temporal (Kurle et al. 2011).

Se recolectaron un total de 6 ítems presas que incluían: poliquetos sedentarios, poliquetos errantes, anémonas, ascidias coloniales, un género de algas pardas (*Dictyota sp.* - Ochrophyta) y un género de algas rojas (*Ceramium sp.* - Rhodophyta). La elección de las presas se realizó en base a los resultados obtenidos a partir del análisis de contenidos estomacales (observaciones directas) y las observaciones *in situ*. En particular, para la elección de las algas también se consideró que su identificación taxonómica fuera precisa, para lo cual se contó con la colaboración de las especialistas en algas Paula Raffo (CESIMAR) y Gabriela Casas (IBIOMAR). Las anémonas se incluyeron como potenciales presas debido a su alta relevancia en la dieta de *P. maculata* según datos bibliográficos (Ottaway 1977, Willan 1984, 1998). Las muestras fueron separadas en el campo en los grupos taxonómicos antes descritos y colocadas en bolsas rotuladas que fueron mantenidas en frío y transportadas hasta el laboratorio donde fueron congeladas en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las algas fueron transportadas en frío hasta el laboratorio donde se las separó taxonómicamente según el género bajo lupa y microscopio óptico.

Para el procesamiento de los ejemplares de *P. maculata*, se extrajo una porción de aproximadamente  $1\text{ cm}^3$  del músculo del pie. En cuanto al procesamiento de poliquetos se realizó una disección manual bajo lupa quitando todas las partes duras y luego se tomaron muestras de músculo. En el caso de los poliquetos sedentarios se incluyeron tentáculos orales. En las anémonas se extrajo músculo de las paredes y tentáculos, mientras que el resto de los ítems presas fueron colocados enteros previa limpieza manual de organismos epibiontes bajo lupa estereoscópica. Entre cada muestra se realizó la limpieza del bisturí y las pinzas con agua destilada y posteriormente etanol 96% para

evitar contaminaciones entre tejidos. Todas las muestras fueron colocadas en tubos *epENDORF* rotulados y posteriormente secadas en estufa a 60°C hasta peso constante (aproximadamente 48 hs), luego molidas manualmente por separado con mortero de vidrio, que era limpiado con alcohol entre muestras. Se realizaron análisis isotópicos independientes para cada muestra de *P. maculata*, mientras que las presas animales se separaron en 4 grupos de 5 individuos cada uno y las algas se separaron en 2 grupos de 3 representantes para cada género.

La proporción de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) para cada muestra se determinó con un espectrómetro de masa en el “Center for Stable Isotopes” de la Universidad de Nueva México, Albuquerque, Estados Unidos. Los resultados de las proporciones isotópicas se informan como valores de  $\delta$  en relación con los estándares internacionales VPDB (Vienna PeeDee Belemnite) y Aire para carbono y nitrógeno, respectivamente. El error analítico fue de 0,2 ‰ para  $^{13}\text{C}$  y 0,3 ‰ para  $^{15}\text{N}$ .

#### *Análisis de datos*

El análisis de las contribuciones relativas de cada presa en la dieta de *Pleurobranchaea maculata*, se realizó mediante un modelo de mezcla utilizando el paquete R SIAR (“*Stable Isotope Analysis in R*”) (Parnell et al. 2010). SIAR resuelve los modelos de mezcla de manera bayesiana, permitiendo ingresar información previa sobre ciertos parámetros, tales como los factores de discriminación (Bond y Diamond 2011, Parnell et al. 2010, Galván et al. 2012). De ese modo, estima la contribución proporcional de cada presa a la dieta del consumidor, cuando éstas presentan valores isotópicos diferentes (Galván et al. 2012). Para el análisis del modelo, las presas se agruparon a posteriori según la cercanía de sus firmas isotópicas (Phillips y Gregg 2003, Phillips et al. 2005, Ward et al. 2011, Phillips et al. 2014), de modo que los poliquetos errantes y sedentarios conformaron un único grupo, las algas *Dictyota* sp. y *Ceramium* sp. fueron agrupadas con las ascidias coloniales, mientras que las anémonas no fueron agrupadas con otros ítems presas.

La elección del factor de discriminación es crucial para el diseño de los modelos de mezcla y pueden verse influenciados por numerosos factores, entre ellos, factores taxonómicos (Cresson et al. 2016). Desafortunadamente no hay estudios específicos que

hayan investigado los factores de discriminación de gasterópodos marinos. Sin embargo, en estudios de reconstrucción de dieta en gasterópodos marinos, los factores de discriminación utilizados fueron  $2,6 \text{ ‰} - 3,4 \text{ ‰}$  (Zabala et al. 2013),  $2 \text{ ‰} - 2 \text{ ‰}$  (Pio et al. 2019) y  $0,4 \text{ ‰} - 2 \text{ ‰}$  (Miranda y Perissinotto 2012), para carbono y nitrógeno, respectivamente. Por ello, los factores de discriminación elegidos para el presente estudio fueron valores intermedios a los publicados:  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 2 \pm 0,25$ ;  $\Delta\delta^{15}\text{N} = 3 \pm 0,25$ . Se probó que los factores de discriminación elegidos no violaran el supuesto del método frecuentista (sensibilidad del polígono de mezcla) propuestos por Smith et al. (2013). El mismo evalúa si el modelo de mezcla bayesiano propuesto, los factores de discriminación tróficos y la incertidumbre de las presas explican adecuadamente el balance de masas para el consumidor considerado (con un 95% de confianza). Para ello se utilizó el script R proporcionado por Smith et al. (2013). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R V.3.5.2 (R Development Core Team, 2013).

#### Nivel trófico e influencia de algas en la dieta de *Pleurobranchaea maculata*

Con el fin de evaluar el consumo de algas, se realizó una captura de 17 ejemplares de *Pleurobranchaea maculata* en zonas profundas (>33 m) cercana al sitio PE, donde previamente, durante un muestreo exploratorio con una cámara sumergible montada sobre un vehículo de operación remota (ROV, por sus siglas en inglés), se comprobó la ausencia de algas. Adicionalmente, se recolectaron en el mismo sitio ejemplares del gasterópodo *Tegula patagonica* (especie herbívora, consumidora de macroalgas) y el bivalvo *Mytilus edulis* (especie filtradora, consumidora de fitoplancton) de la zona costera de PE, dado que sus valores isotópicos sirven como indicadores de los niveles basales de las cadenas alimenticias bentónicas y pelágicas, respectivamente (Post 2002). El muestreo se realizó en enero de 2018 en la misma franja temporal que para los individuos costeros de *P. maculata* (Kurle et al. 2011). El transporte de las muestras hasta el laboratorio, el procesamiento y análisis siguieron la metodología previamente explicada (ver: Estudio de dieta mediante métodos indirectos - *Análisis de isótopos estables de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$* ). De igual modo, se realizaron análisis isotópicos independientes para cada muestra de *P. maculata*, mientras que para los ejemplares de *T. patagonica* y *M. edulis* se realizaron 5 muestras de 3 individuos agrupados por grupo taxonómico.

## Análisis de datos

Los niveles tróficos de *Pleurobranchaea maculata* con hábitos costeros y profundos se calcularon siguiendo dos metodologías. Por un lado, se utilizó la ecuación propuesta por Post (2002):

$$NT_{\text{consumidor}} = \lambda + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumidor}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}) / \Delta\delta^{15}\text{N} \text{ (ecuación 1)}$$

donde  $\lambda = 2$  es la posición trófica de los organismos utilizado para estimar el valor  $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$  es el promedio entre los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del gasterópodo herbívoro *Tegula patagonica* y el bivalvo filtrador *Mytilus edulis* y  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  es el factor de discriminación previamente calculado (ver: Estudio de dieta mediante métodos indirectos - *Análisis de datos*). Por otro lado, se calcularon los niveles tróficos mediante el modelo bayesiano con dos líneas de base sugerido por Quezada-Romegialli et al. (2018), con el paquete “*tRophicPosition*” para el software R. Este modelo presenta la ventaja que considera las contribuciones de cada vía trófica (bentónicas y pelágicas) en el cálculo del nivel trófico del consumidor.

A su vez se realizaron comparaciones tróficas de ambos grupos de *P. maculata* mediante la estimación de sus nichos isotópicos, siguiendo a Jackson et al. (2011). Se calculó el tamaño y la posición de la elipse estándar (“*Standard Ellipses Area*”, SEA), la cual describe en forma univariada la variación en los ejes  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ . Se compararon las áreas y el solapamiento de ambas elipses (nichos isotópicos) para poner a prueba la diferencia entre nichos isotópicos con un intervalo de confianza de 95%, con el paquete SIBER (“*Stable Isotope Bayesian Ellipses in R*”) para el software R (Jackson et al. 2011, Jackson et al. 2012). De este modo, se evalúa si *P. maculata* presenta igual variabilidad en cuanto a su dieta dentro de cada sitio y entre sitios. Con el mismo fin, se realizó el análisis de centroides sugerido por Turner et al. (2010), que pone a prueba las diferencias en la ubicación del centroide y la dispersión de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  dentro y entre los grupos de datos isotópicos.

En todos los casos se utilizaron los factores de discriminación anteriormente corroborados (ver: Estudio de dieta mediante métodos indirectos- *Análisis de datos*). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R V.3.5.2 (R Development Core Team, 2013).

## Resultados

### 1. Estudio de dieta mediante métodos directos

#### Determinación del contenido estomacal

El porcentaje de estómagos vacíos encontrados durante el análisis de los contenidos estomacales de *Pleurobranchaea maculata* fue de 3,28% y 12,19% para los sitios Punta Este (PE) y Follías (Fo), respectivamente. Los mismos no fueron considerados en el cálculo del porcentaje de ocurrencia (O%) de cada ítem presa.

Los animales encontrados en los contenidos estomacales representaron más del 60% de los ítems presas encontrados (Tabla 6). Se registró el consumo de algas en ambos sitios de muestreo con una ocurrencia del 28,77 O% y 37,63 O% para los sitios PE y Fo, respectivamente (Fig. 33). Los grupos de algas encontrados comprendieron las Chlorophyta, Rhodophyta y Ochrophyta, siendo estas dos últimas las más abundantes en ambos sitios de muestreo (Tabla 6).

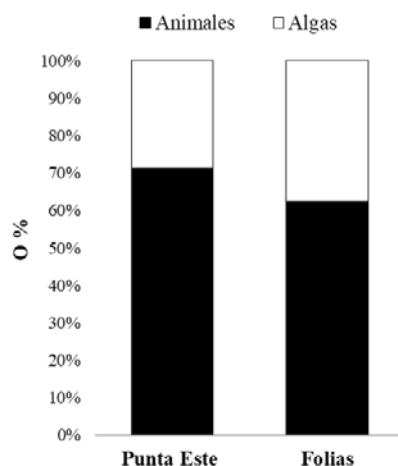


Figura 33. Porcentaje de ocurrencia (O%) de ítems presas animales (negro) y algas (blanco) encontrados en el contenido estomacal de *Pleurobranchaea maculata* en ambos sitios de muestreo.

Se observaron diferencias significativas en la proporción de ingesta de algas y animales tanto en PE ( $\chi^2 = 38,20$ ; gl = 1;  $p = 6,36 \times 10^{-10}$ ) como en Fo ( $\chi^2 = 5,68$ ; gl = 1;  $p = 0,01$ ). No se observaron diferencias significativas en la proporción de ingesta de algas y animales entre sitios de muestreo ( $\chi^2 = 2,35$ ; gl = 1;  $p = 0,12$ ).

Las proporciones de los distintos grupos de presas animales difirieron significativamente entre sitios ( $\chi^2 = 60,34$ ; gl = 17;  $p = 9,21 \times 10^{-7}$ ). El principal grupo consumido en ambos sitios fue poliquetos sedentarios (Tabla 6). Las partes predominantes encontradas fueron los tentáculos y las branquias de la familia Terebellidae (Fig. 34-A), representados por 25 O% para PE y 21,50 O% para Fo. La mayor diferencia entre sitios se observó en relación al tunicado colonial *Diplosoma listerianum* (Fig. 34-D-E) representando la segunda presa más consumida en PE con un 22,17 O%, mientras que en Fo se vio representado por un 7,52 O% (Tabla 6).

Algunos ítems presas estuvieron poco representados en ambos sitios. Los nematodos (Fig. 34-I) y diversos pólipos de hidrozoos (Fig. 34-F) representaron valores variables en el O% en cada sitio (Tabla 6). Si bien los pólipos de hidrozoos se encontraban mayoritariamente como presas aisladas en los contenidos estomacales, en algunos casos se encontraron como especies epibiontes del género *Dictyota* (Ochrophyta). No se observaron pólipos epibiontes de hidrozoos sobre otras algas.

Algunos ítems presas estuvieron representados únicamente en uno de los sitios, con valores variables de O%. En PE se encontró un brazo de pulpo (Octopodidae) (Fig. 34-J), un heteronemertino y numerosos huevos de peces (Tabla 6). En Fo se encontraron restos de un individuo de *P. maculata* correspondiente a un evento de canibalismo, un nudibranquio (*Doris fontainii*) (Fig. 34-H), cinco estómagos conteniendo actiniarios (Fig. 34-G) y cinco casos de palpos labiales correspondientes a bivalvos mytilidos (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de ocurrencia (O%) de cada presa en los contenidos estomacales de *Pleurobranchaea maculata* para el sitio Punta Este (PE) y Foliás (Fo) del Golfo Nuevo, Patagonia Argentina.

Phylum	Clase	Orden	Especies y/o especificaciones	O%	
				Punta Este	Foliás
Porifera	Demospongiae			1,41	1,07
Nemertea	Heteronemertean			0,94	0,00
Nematoda	Nematoda			2,35	6,45
Cnidaria	Hydrozoa		Estadio pólipa	8,01	2,15
Arthropoda	Anthozoa	Actiniaria		0,00	5,37
	Maxilopoda	Copepoda		2,83	1,07
	Malacostraca	Amphipoda		1,41	1,07
Annelida	Polychaeta		Poliquetos sedentarios	25,00	21,50
	Polychaeta		Poliquetos errantes	4,71	8,60
Mollusca	Cephalopoda	Octopoda	Brazo de Octopodidae	0,47	0,00
	Bivalvia	Mytiloidea	Mytilidae	0,00	5,37
	Gastropoda		<i>Doris fontainei</i> (Nudibranchia)	0,00	1,07
	Gastropoda		<i>Pleurobranchaea maculata</i> (Pleurobranchomorfa)	0,00	1,07
Chordata	Ascidacea	Enterogona	<i>Diplosoma listerianum</i>	22,17	7,52
	Vertebrata		Ovicápsulas de osteictios	1,88	0,00
Ochrophyta				11,32	15,05
Chlorophyta				0,94	8,60
Rhodophyta				16,50	13,97

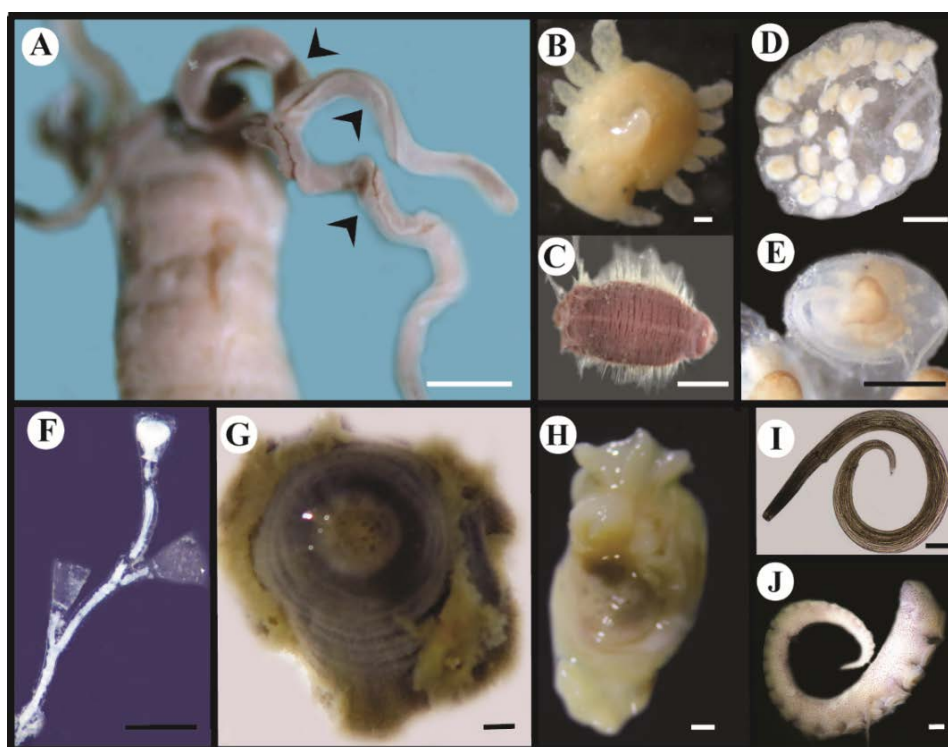


Figura 34. Ejemplares encontrados en el contenido estomacal de *Pleurobranchaea maculata*. A–C, Polychaeta: A- Poliqueto sedentario con tentáculos orales (flechas). B- Poliqueto juvenil. C- Poliqueto errante. D–E, Tunicado colonial *Diplosoma listerianum*: D- Zooides. E- Detalle de larva embrionaria adherida a la colonia. F- Hydrozoa. G- Anthozoa. H- *Doris fontainei* (Nudibranchia). I- Nematode. J- Brazo de Octopodidae. Escalas: A, D–F: 0,5 mm; B, H: 0,1 mm; C, G y J: 1 mm, I: 0,1  $\mu$ m. Fotografías: Verena Bökenhans.

### Observación de eventos de alimentación *in situ*

Los eventos de alimentación registrados fueron aquellos en los que los individuos presentan el velo oral posicionado hacia arriba y el aparato bucal extendido hacia afuera sujetando la presa (Fig. 35-A, B). Se registraron únicamente siete eventos de alimentación en el campo, de los cuales cuatro correspondieron a algas filamentosas rojas (Rhodophytas) (Fig. 35-A). Los individuos de *Pleurobranchaea maculata* fueron observados alimentándose de un gasterópodo (*Trophon geversianus*), de tentáculos de medusa (*Chrysaora plocamia*) (Fig. 35-B) y de un brazo de pulpo octopódido (Fig. 35-C).

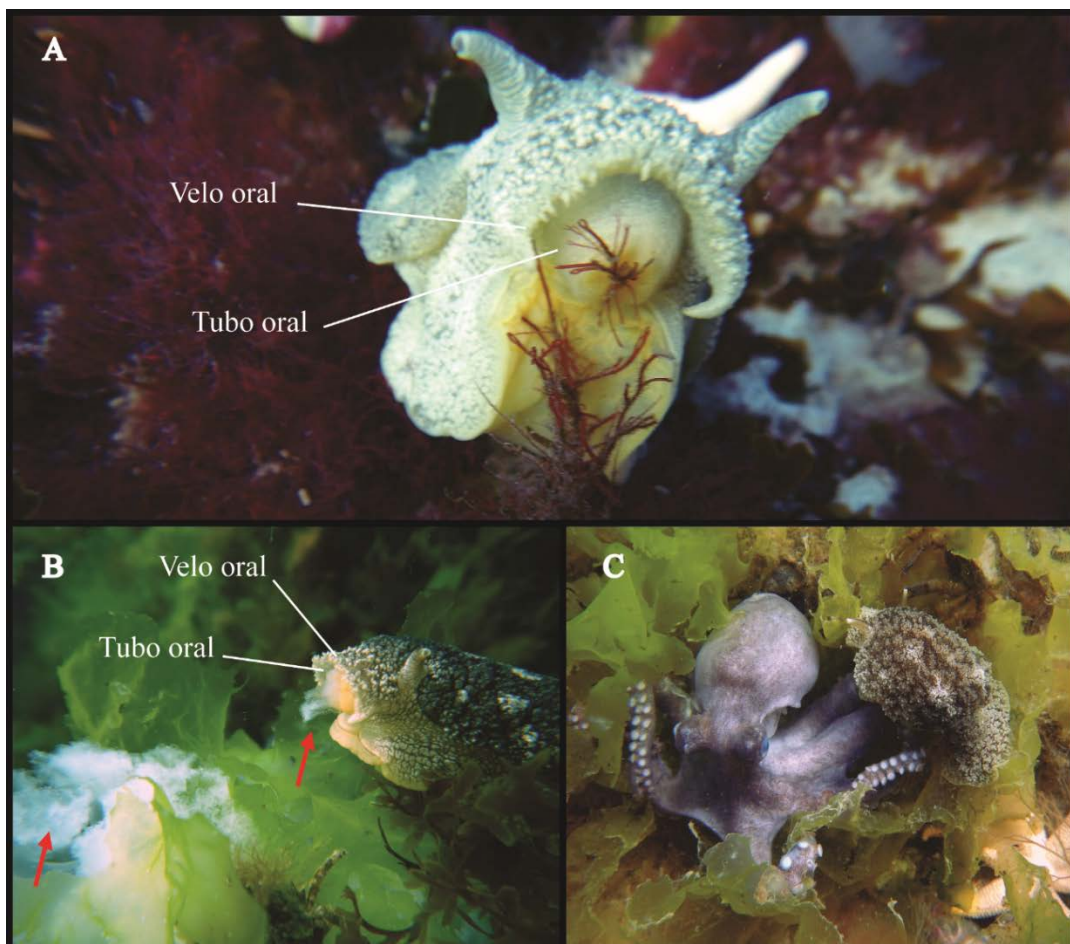


Figura 35. Observaciones de alimentación *in situ*. Individuos de *Pleurobranchaea maculata* alimentándose de: A- Alga roja filamentosas, B- Tentáculo de medusa (*Chrysaora plocamia*) (flecha) y C- Pulpito tehuelche (*Octopus tehuelchus*). A-B: Se observa el velo oral posicionado hacia arriba y el tubo oral extendido hacia afuera sujetando la presa. Fotografías: A, B: Andrés Averbuj, C: Gregorio Bigatti.

## 2. Estudio de dieta mediante métodos indirectos

### Análisis de isótopos estables de $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$

Los individuos de *Pleurobranchaea maculata* de hábitos costeros mostraron un rango de valores isotópicos que variaron entre  $-15,8\text{‰}$  y  $-18,9\text{‰}$  para  $\delta^{13}\text{C}$  mientras que para  $\delta^{15}\text{N}$  variaron entre  $15,5\text{‰}$  y  $17,8\text{‰}$  (Fig. 36-A). El análisis de sensibilidad de polígonos de mezcla (utilizando 1500 iteraciones) mostró que los valores isotópicos de todas las muestras individuales, dados los factores de discriminación elegidos para el presente estudio ( $\Delta\delta^{13}\text{C} = 2 \pm 0,25$ ;  $\Delta\delta^{15}\text{N} = 3 \pm 0,25$ ) y los valores isotópicos de las presas, fueron incluidos en más del 95% de los polígonos de mezcla simulados, validando el modelo de mezcla propuesto (Fig. 37-B).

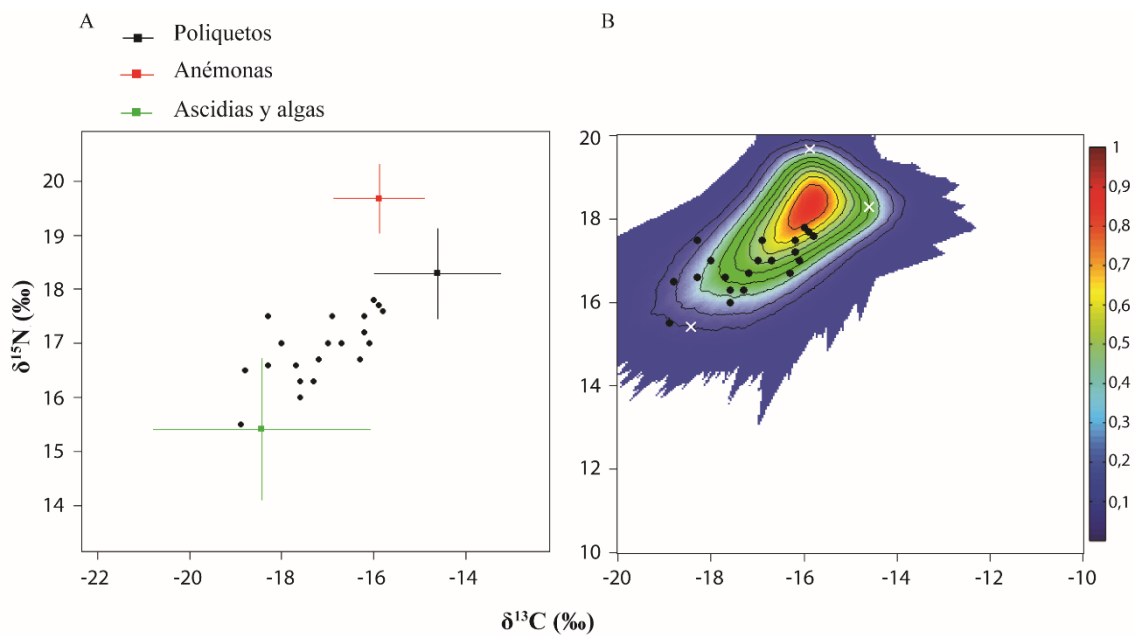


Figura 36. Representación gráfica de los valores de los isótopos estables de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de *Pleurobranchaea maculata*. A- Modelo de mezcla de *P. maculata*. Se indican los valores medios y error estándar de las presas: poliquetos (negro), anémona (rojo), ascidias y algas rojas agrupadas debido a la cercanía de sus firmas isotópicas (verde) y los valores individuales para *P. maculata* (puntos negros). B- Polígonos de mezcla simulada para el modelo de mezcla en la Fig. 36-A. Se muestran las posiciones individuales de *P. maculata* (puntos negros) y los valores promedios de las presas (cruces blancas). Los contornos de probabilidad representados corresponden al 5% (contorno exterior) y aumentando cada 10% hasta su máximo de 95%.

La contribución proporcional de cada presa a la dieta de *P. maculata*, calculados a partir del modelo de mezcla, sugieren un mayor consumo de ascidias y algas (62,53 %) y anémonas (24,48 %) que de poliquetos (13 %) (Fig. 37). La contribución estimada de cada grupo de presas a la dieta de *P. maculata* se muestra en la Fig. 37.

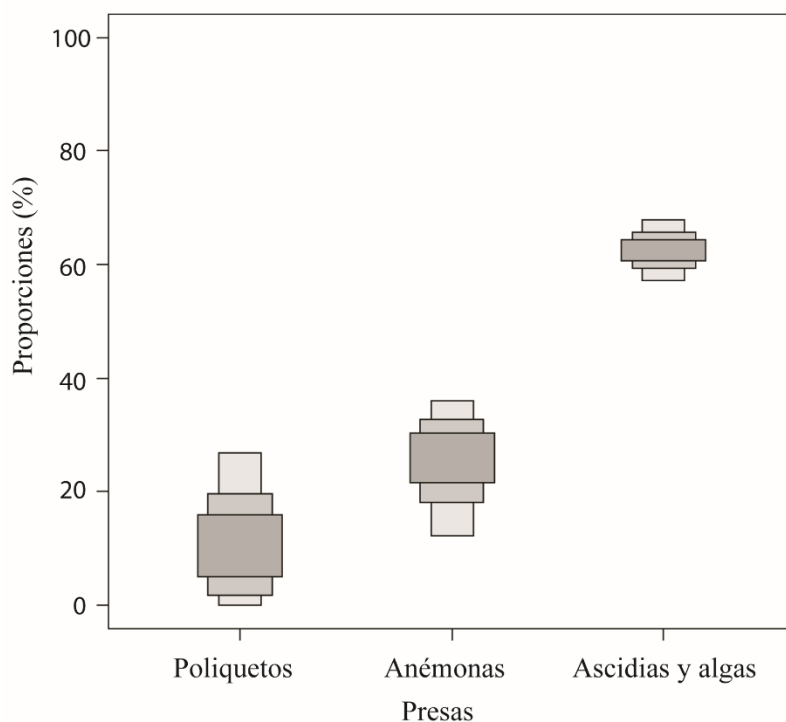


Figura 37. Contribución proporcional de cada grupo de presas a la dieta de *Pleurobranchaea maculata*, estimados mediante el modelo bayesiano de mezcla SIAR (Stable Isotope Analysis in R; Parnell et al. 2010), obtenido a partir de 500000 iteraciones. Las cajas muestran las contribuciones estimadas de cada presa a la dieta de *Pleurobranchaea maculata* para los intervalos de confianza bayesianos del 50% (gris oscura), 75% (gris intermedio) y 95% (gris claro).

### Nivel trófico e influencia de algas en la dieta de *Pleurobranchaea maculata*

Los individuos de *Pleurobranchaea maculata* de zona profundas mostraron un rango de valores isotópicos que variaron entre -17,1 ‰ y -19,5 ‰ para  $\delta^{13}\text{C}$  mientras que para  $\delta^{15}\text{N}$  variaron entre 16,3 ‰ y 18,3‰ (Fig. 38). Los niveles tróficos calculados, utilizando la ecuación 1, fueron 3,22 (IC = 2,79 - 3,46) para los individuos con hábitos profundos y

2,99 (IC = 2,52 - 3,29) para los individuos de hábitos costeros. Las diferencias entre los niveles tróficos de ambos grupos aumentan levemente al ser calculados mediante el modelo bayesiano propuesto por Quezada-Romegialli et al. (2018), donde los valores son 3,30 (IC = 3,25 - 3,35) para los individuos con hábitos profundos y 2,73 (IC = 2,37 - 3,08) para los individuos de hábitos costeros (Fig. 38).

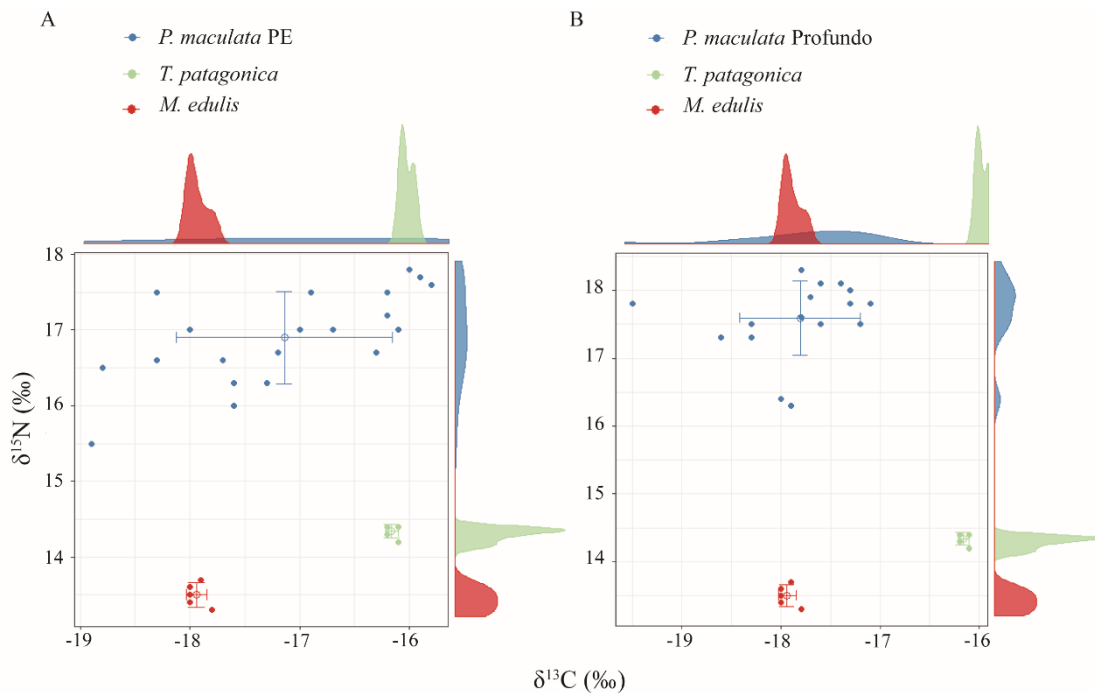


Figura 38. Posiciones tróficas de ambos grupos de *Pleurobranchaea maculata* utilizando como línea de base al gasterópodo herbívoro *Tegula patagonica* y el bivalvo filtrador *Mytilus edulis*. Para cada grupo se indican los valores medios y error estándar. A- *Pleurobranchaea maculata* de hábitos costeros. B- *Pleurobranchaea maculata* de hábitos profundos.

La distancia media entre centroides de ambos grupos, muestra diferencias significativas en la posición los nichos isotópicos ( $p < 0,01$ ) (Fig. 39). Por lo tanto, los individuos de *P. maculata* con hábitos costeros y profundos difieren en sus nichos isotópicos, lo que implica dietas distintas entre ambos grupos. A su vez, se observa un solapamiento muy pequeño (cercano a cero) entre los nichos isotópicos, representando un 0,54% (IC= 0 - 7,36) para los individuos con hábitos profundos y un 0,98% (IC= 0 - 10,48) para los individuos de hábitos costeros.

El tamaño de la elipse de los individuos de hábitos costeros, según las medidas de las elipses  $SEA_B$ , es mayor que la de los individuos de hábitos profundos (*P. maculata* de hábitos costeros:  $SEA_B = 1,41$ ;  $IC = 0,91 - 2,25$ ; *P. maculata* de hábitos profundos:  $SEA_B = 0,97$ ;  $IC = 0,59 - 1,62$ ) (Fig. 39). Esto sugiere que los individuos de hábitos costeros presentan una dieta más variada que los de hábitos profundos, sin embargo esta diferencia no es significativa ( $p > 0,05$ ) al comparar las áreas de las elipses y es marginalmente no significativa ( $p = 0,053$ ) en cuanto a la distancia media al centroide.

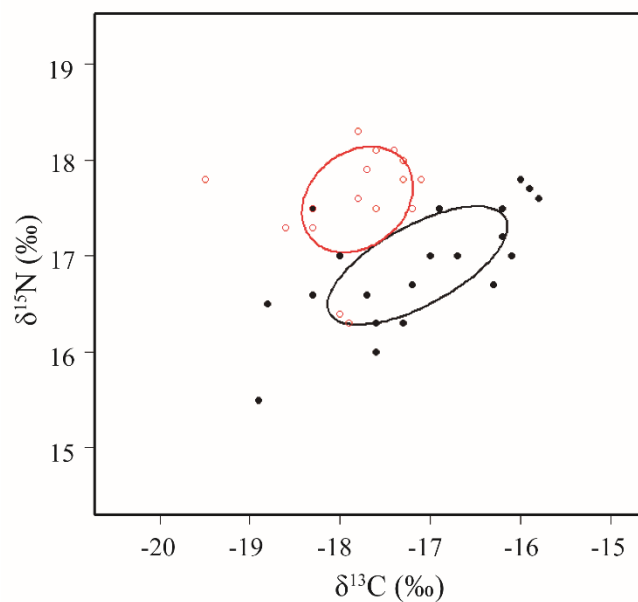


Figura 39 Elipses estándar ( $SEA_B$ ) calculadas para *Pleurobranchaea maculata* de hábitos costeros (negro) y de hábitos profundos (rojo). Los puntos representan los valores de los isotopos estables de  $\delta^{13}C$  (‰) y  $\delta^{15}N$  (‰) de *Pleurobranchaea maculata* de hábitos costeros (negro) y de hábitos profundos (rojo).

## Discusión

El análisis de los contenidos estomacales revelan que los individuos de *Pleurobranchaea maculata* incorporan tanto presas animales como algas en su dieta. La ingesta de un abundante porcentaje de algas observado en esta Tesis no ha sido descrita previamente para ninguna especie del género en otras partes del mundo. De hecho, Willan (1998) describe las algas como alimento inaceptables para esta especie. El alto porcentaje de ocurrencia de las algas en ambos sitios de muestreo refleja su importancia en la dieta

de *P. maculata* en su nuevo hábitat, consumiendo Rhododphytas y Ochrophytas sobre Chlorophytas. Las observaciones *in situ* conciden con los resultados de los contenidos estomacales, dado que cuatro de siete eventos de alimentación de algas registrados en el campo correspondieron a algas filamentosas rojas. Por otro lado, los niveles tróficos calculados mediante isótopos estables difieren entre los individuos que habitan zonas costeras y profundas. La incorporación de algas en la dieta de los individuos costeros podría explicar el nivel trófico más bajo observado en estos.

La posibilidad de que *P. maculata* pudiera estar incorporando algas de manera accidental en su dieta, debido a la presencia de especies epibiontes sobre las mismas, parece poco probable teniendo en cuenta la presencia de pólipos de hidrozoos epibiontes solamente en algunas algas Ochrophytas del género *Dictyota*. La calidad nutricional de algunas macroalgas les brinda la potencialidad de actuar como fuente de alimento (Kaehler y Kennish 1996). Por lo general, las Rhodophytas y Ochrophytas tienen los niveles nutricionales más altos, mientras que las Chlorophytas los más bajos cuando se considera la cantidad total de minerales presentes, los contenidos de lípidos y carbohidratos solubles (Kaehler y Kennish 1996, Fleurence 1999, McDermid y Stuercke 2003, Gressler et al. 2010). Por otro lado, las algas son una fuente interesante de compuestos bioquímicos (Burtin 2003), entre ellos aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), que proporcionan protección UV a los consumidores primarios y secundarios (Bhatia et al. 2011). La riqueza de MAAs en las puestas de gasterópodos depende de la dieta (Carefoot et al. 1998, Przeslawski 2004). Se reportó el doble de concentración de MAAs en las masas ovígeras provenientes de adultos de *Aplysia dactylomela* (Opisthobranchia) cuando se alimentaron de algas rojas en lugar de algas verdes (Carefoot et al. 1998). Las masas ovígeras de tres especies de la familia Pleurobranchaeidae contienen estos compuestos químicos (Przeslawski 2004). En particular, las puestas de *P. maculata* en el sitio de PE presentan MAAs (comunicación personal de la Dra. Soledad Zabala), lo que sugiere que la especie podría estar aprovechando éstos compuestos químicos.

Las especies del género *Pleurobranchaea* han sido descritas como especies generalistas (Willan 1984, Cattaneo-Vietti et al. 1993, Battle y Nybakken 1998, Willan 1998), las cuales pueden adaptar su dieta a los recursos disponibles en el ambiente (Richmond et al. 2005). Las diferencias en la ingesta de ítems presa entre los sitios de muestreo (PE y Fo) probablemente estén reflejando las diferencias relacionadas en la

disponibilidad de presas entre ellos. El naufragio Foliás, ubicado en Playa Paraná, es un sustrato artificial situado sobre un fondo mixto de arena y grava. Los sustratos artificiales pueden albergar ensambles diferentes a los encontrados en ambientes naturales (Dafforn et al. 2015), observándose mayor cantidad de individuos sésiles (Ruiz et al. 2009). Las principales diferencias de ítems presas que se observaron entre sitios corresponden a individuos sésiles, tales como anémonas y bivalvos, las que únicamente se encontraron presentes en los individuos recolectados en el naufragio Fo. Las ascidias coloniales se encontraron en menor frecuencia en los contenidos estomacales de Fo a pesar de ser individuos sésiles. Sin embargo, la abundancia de ascidias coloniales en las comunidades de *fouling* difiere entre los tipos de sustratos disponibles, siendo menor en superficies planas (Mook 1981), como es el caso de Fo. Las ascidias coloniales se encuentran sobre rocas y principalmente sobre algas del género *Codium*, las cuales son principalmente abundantes en el sitio PE, por lo que es esperable que la abundancia de ascidias sea mayor en este sitio.

Complementariamente, los análisis isotópicos entre los individuos de zonas costeras y profundas, muestran nichos isotópicos distintos entre grupos, lo que se ve reflejado por la diferencia significativa en la distancia media entre los centroides y el escaso solapamiento de las elipses. La diferencia entre nichos isotópicos implica dietas distintas entre grupos. Todo esto evidencia que la especie *P. maculata* presentaría una amplia plasticidad en el uso de los recursos, variando el consumo de los ítems principales de su dieta, dependiendo de la composición faunística del sitio que habita.

En cuanto a la variabilidad en el uso de los recursos entre los individuos de la zona costera y profundas, los resultados sugieren una mayor variabilidad en el uso de los recursos entre los individuos de la zona costera. Si bien, la diferencia entre el tamaño de las elipses  $SEA_B$  es no significativa, se observa un mayor intervalo de confianza en los individuos de la zona costera. A su vez, al comparar la distancia media entre centroides la variabilidad dentro de cada grupo es apenas marginalmente no significativa. Esta variabilidad podría deberse a la mayor disponibilidad de recursos en la zona costera respecto a la profunda, especialmente por ausencia de algas en la última. La riqueza y distribución de especies en ambientes marinos pueden verse afectados por numerosas variables ambientales tales como la profundidad, la velocidad de las corrientes, el tipo de sedimento, entre otros (Pearson 1970, Coleman et al. 1997, Gray 2002, Coleman et al. 2007, Hewitt et al. 2008). Por lo tanto, para poder hacer inferencias precisas acerca de la

variabilidad observada en el presente trabajo, son necesarios estudios que describan la composición de especies en ambos sitios de muestreo. Sin embargo, una mayor disponibilidad de presas en la zona costera podría explicar la mayor variabilidad dentro de los individuos costeros que dentro de los profundos, lo que a su vez enfatizaría la plasticidad en el uso de recursos en la dieta de *P. maculata*.

El análisis de contenidos estomacales en conjunto con el de isótopos estables de carbono y nitrógeno, brindan información importante para detectar las relaciones tróficas de los ecosistemas marinos de manera apropiada (Zanden y Rasmussen 2001). Mediante ambas técnicas se observan diferencias entre las proporciones de la contribución relativa de cada grupo presa en la dieta de *P. maculata*. A pesar de haber observado porcentajes de ocurrencia nula de anémonas en los contenidos estomacales de la zona costera de PE, esta presa fue incluida en el análisis isotópico debido a su alta relevancia en la dieta de *P. maculata* según datos bibliográficos. Los actinarios se describieron como presas preferidas para numerosas especies del género *Pleurobranchaea* (Willan 1984, Cattaneo-Vietti et al. 1993, Battle y Nybakken 1998, Willan 1998). Ottaway (1977) describió el comportamiento de alimentación de *P. maculata* en *Actinia tenebrosa* (Anthozoa), observando que los individuos se alimentan paulatinamente del tejido columnar de la anémona, mientras éstas se encuentran altamente contraídas. Por lo tanto, los actinarios rara vez son comidos enteros observándose en los contenidos estomacales como material altamente degradado sin estructuras identificables, probablemente subestimando este ítem presa mediante la utilización del método directo. Por ello, la proporción calculada mediante el modelo bayesiano de mezcla, probablemente represente de manera más certera la contribución relativa de las anémonas en la dieta de *P. maculata*.

Asimismo, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante técnicas directas, una gran proporción de la dieta identificable de *P. maculata* en PE, está representada por poliquetos sedentarios, como presas principales, ascidias coloniales y algas. La incorporación de poliquetos sedentarios en la dieta de *P. maculata* fue reportado con anterioridad (Salvitti et al. 2017). Al comparar entre metodologías directas e indirectas utilizadas, la mayor contribución proporcional de ascidias y algas observada mediante el método indirecto, posiblemente se deban al agrupamiento a posteriori de los valores isotópicos de éstas presas (ver Materiales y Métodos, 2- *Estudio de dieta mediante métodos indirectos*). Sin embargo, si se combinan los porcentajes de ocurrencias calculados mediante técnicas directas para cada grupo, los resultados son consistentes con

las proporciones de las contribuciones relativas de las presas en el análisis de isótopos estables.

La mayoría de las especies de *Pleurobranchaea* fueron descritas como consumidores de carroña (Willan 1984, Cattaneo-Vietti et al. 1993, Battle y Nybakken 1998, Willan 1998). En este estudio, la ingesta del brazo del pulpo octopódido y del tentáculo de la médusa *Chrysaora plocamia* (especies altamente móviles) en la dieta de *P. maculata*, sugiere esta modalidad de alimentación. En un estudio reciente en el Golfo de Hauraki (Nueva Zelanda), los valores isotópicos ( $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ ) obtenidos para *P. maculata* fueron relativamente similares a la de los consumidores de carroña y, en particular, revelaron la incorporación de bivalvos filtradores en su dieta (Taylor et al. 2015). Según Willan (1984), *P. maculata* ataca activamente los organismos con conchas protectoras, pero no logra ingerirlos. Por lo tanto, la presencia de partes blandas de bivalvos Mytilidae encontrados en los contenidos estomacales, así como el evento de alimentación registrado durante la observación *in situ* del caracol *Trochon geversianus*, reflejen posibles eventos de consumo de carroña.

El comportamiento depredatorio observado en *P. maculata* es similar al descrito previamente para *P. californica* (Morse 1984, McClellan 1982) y permitió reconocer con facilidad aquellos animales que se encontraron alimentándose en el campo. El bajo número de eventos de alimentación registrados, durante las observaciones *in situ*, probablemente esté relacionado a hábitos nocturnos de *P. maculata*, como ha sido reportado para *P. californica* (Davis et al. 1977, Willan 1984).

En conclusión, este estudio refuerza la importancia del uso conjunto de métodos directos e indirectos para describir la composición dietaria de las especies y sus relaciones tróficas. La especie *P. maculata* presenta una amplia plasticidad en el uso de los recursos y su dieta en el nuevo hábitat está constituida por una amplia variedad de presas, incluyendo las algas, las cuales podrían ofrecerle beneficios adicionales a los estrictamente nutricionales. Por ello, la elaboración de un adecuado programa de monitoreo y manejo de la especie introducida, así como el monitoreo de cambios futuros en las comunidades bentónicas invadidas por *P. maculata* resultan relevantes, dado que las características dietarias descritas para la especie podrían reflejar un rápido establecimiento de la especie invasora a lo largo de la costa Argentina en una amplia variedad de ecosistemas.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de esta Tesis evidencian que *Pleurobranchaea maculata* presenta aspectos de su biología reproductiva y ecología trófica que contribuyen a explicar el éxito de establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina. En particular, *P. maculata* sería una especie semélpara con un ciclo reproductivo anual, luego del cual moriría, al igual que ha sido descrito en otras especies de opistobranquios (Todd 1979, Todd y Doyle 1981, Todd 1983, Havenhand y Todd 1988, Cattaneo-Vietti et al. 1993). Esto se vio reflejado mediante el estudio del ciclo gametogénico en conjunto con los diferentes tipos de células gonadales que sufren apoptosis durante el mismo, así como en el solapamiento temporal en el que coexisten individuos inmaduros con individuos post-reproductivos (con ausencia de individuos maduros, es decir, reproductivos). Las especies semélparas se enfrentan en cada ciclo reproductivo al desafío de alcanzar un tamaño poblacional mínimo para lograr un remplazo de generación (Friedenberg et al. 2007, Acker et al. 2014). Ciertas características biológicas y poblacionales, tales como una alta probabilidad de ser hembra (en especies dioicas), una alta posibilidad de ser fertilizada, una alta supervivencia de la progenie y de los adultos y una alta fecundidad, entre otras, le permitiría a la especie sobrellevar ese desafío (Jerde et al. 2009). En este sentido, pareciera que en *P. maculata* el éxito de lograr un remplazo de generación se vería favorecido al ser una especie hermafrodita, donde todos los individuos presentan la capacidad de dejar descendencia. A su vez, la fecundación cruzada con alto grado de reciprocidad observada, junto con la capacidad de almacenar esperma favorece altas tasas de fertilización (Nakadera y Koene 2013).

El comportamiento de cópula observado en *P. maculata* inicia cuando un individuo sigue activamente el rastro de otro. En algunas especies de opistobranquios el comportamiento de cópula se ve motivado por efecto de feromonas (Audesirk 1977). Esta estrategia reproductiva aumenta la posibilidad de encuentros de cópula siendo de fundamental importancia en especies semélparas, para garantizar la fertilización (Jerde et al. 2009). Por otro lado, el comportamiento de cópula observado combina una etapa de transferencia interna de fluidos en la abertura genital femenina seguida de una transferencia hipodérmica post-copulatorias. Este particular comportamiento copulatorio podría presentar un efecto directo a nivel gonadal en el individuo receptor de la inyección reduciendo la producción espermática disponible para la cópula (lo que se

observa en los cortes histológicos como una desorganización de la estructura acinar espermatogénica), implicando una relación directa con las estrategias adaptativas de selección sexual (Schmitt et al. 2007). En este aspecto se abren nuevas interrogantes acerca de la composición de las secreciones transferidas durante el evento de cópula en cada etapa. En particular, la presencia de alohormonas y los mecanismos fisiológicos y ventajas adaptativas a través de los cuales actuarían (Koene y ter Maat 2001).

*Pleurobranchaea maculata* presenta una alta estacionalidad en su ciclo reproductivo, la cual se vio principalmente reflejada mediante la presencia de oocitos maduros en las gónadas a partir de julio, que coinciden con la presencia de masas ovígeras en el campo. Esto se relaciona a un aumento en el fotoperíodo que pareciera promover el inicio del período de oviposición. A lo largo de este período el fotoperíodo influiría, a su vez, en la frecuencia de oviposición. De este modo, el máximo de masas ovígeras se encuentran en enero cuando las horas de luz alcanzan su máximo. Por otro lado, la temperatura mostró un efecto directo sobre el tiempo de desarrollo embrionario y la talla de eclosión. El desarrollo embrionario resultó exitoso dentro de un rango térmico similar a las fluctuaciones del agua de mar observadas a lo largo del año en el sitio de estudio (10 a 18 °C). La variación en la talla y en el tiempo durante el desarrollo embrionario a distintas condiciones de temperatura, le permite a la especie enfrentarse a condiciones ambientales cambiantes (León y Vargas 2009, Weis 2010). Según los resultados de esta Tesis, las primeras masas ovígeras encontradas a partir de julio, desarrollarían más lento y alcanzarían menores tallas que aquellas depositadas hacia el final del período de oviposición (febrero), momento en el que la temperatura del agua alcanza su máximo. De este modo la temperatura y el fotoperíodo intervendrían de manera complementaria en el ciclo reproductivo de *P. maculata*. El fotoperíodo influiría en el número de puestas, implicando que una mayor cantidad de larvas sean liberadas cuando las condiciones térmicas sean más favorables para el crecimiento y la supervivencia larval (Aldana-Aranda et al. 2001, O'Connor et al. 2007, Ruiz et al. 2008).

*Pleurobranchaea maculata* presentó un largo período de oviposición durante el cual presentó numerosos eventos de desove (al menos 5 por individuo en condiciones experimentales en acuarios) que consistieron en masas ovígeras con más de 100.000 embriones por puestas, acompañado por un corto tiempo de desarrollo embrionario que finalizó con la liberación de una larva planctotrófica. Estas características reproductivas, donde una gran parte de la inversión energética de los adultos garantiza un gran número

de descendencia con fase dispersiva, contribuyen a explicar parcialmente el éxito de expansión de *P. maculata* a lo largo de la costa Argentina. La capacidad de dispersión de las larvas planctónicas por las corrientes marinas y la advección impulsada por los vientos, favorece la propagación de la especie (Grosholz 1996). A su vez, los límites de tolerancia térmica para un desarrollo embrionario exitoso, sugieren que la especie podría ampliar su rango de distribución hacia el sur a lo largo del Golfo San Jorge.

En cuanto a la dieta de *P. maculata* en Golfo Nuevo, la incorporación de algas podría ser el resultado de adaptaciones al nuevo hábitat. En nuevos ambientes, las especies exóticas pueden explorar nuevas interacciones bióticas, que no se encuentran disponibles para las especies en el área nativa (Battini et al. 2019). Por ello, es posible que *P. maculata* haya ampliado su nicho alimentario en el nuevo hábitat como fuente nutricional, o bien que incorpore algas de modo de suplantar compuestos naturales que en su hábitat nativo adquiere por otros medios, como podrían ser aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), que proporcionan protección UV para los embriones, o bien, tetradotoxina o sus precursores que le proporcionan un mecanismo de defensa a los adultos.

Los estudios dietarios revelaron que *P. maculata* muestra una amplia plasticidad en el consumo de ítems presas, dependiendo de la composición faunística del sitio que habita. La amplia plasticidad encontrada resulta favorable en especies introducidas ya que permite adaptarse a la nueva oferta de presas del hábitat. Por otro lado, resulta importante destacar que las poblaciones de *P. maculata* que habitan las costas de Argentina presentan una potente neurotoxina (Farias et al. 2019), la cual podría ser adquirida a través del alimento (Khor et al. 2014). De modo que el estudio de la dieta de *P. maculata* en esta zona, sirve de insumos para evaluar la posible fuente de toxina para la especie en la zona, así como para realizar estudios que cuantifiquen los impactos directos e indirectos que la presencia de este nuevo depredador produce en el nuevo ecosistema.

Los resultados de esta Tesis brindan información importante acerca de la biología reproductiva y ecología trófica de la especie y ayudan a explicar la rápida expansión de la misma a lo largo de la costa Argentina. Debido a su capacidad expansiva y plasticidad en el uso de recursos parece importante sugerir que se establezcan planes de manejo y prevención de modo de preservar el ecosistema nativo y evitar problemas sanitarios.

## CONCLUSIONES

- ✦ *Pleurobranchaea maculata* sería una especie semélpara con ciclo de vida anual, la cual presenta una mayor actividad reproductiva entre julio y enero, encontrándose durante los meses de febrero y marzo principalmente individuos post-reproductivos e inmaduros.
- ✦ El mecanismo de cópula combina una etapa de transferencia interna con una etapa de transferencia hipodérmica post- copulatorias, con un alto grado de reciprocidad.
- ✦ Se observa una marcada influencia del fotoperiodo sobre el inicio del período de oviposición así como en la frecuencia de masas ovíferas.
- ✦ *Pleurobranchaea maculata* presenta una alta fecundidad anual con eclosión de estadios larvales planctotróficos lo que podría facilitar la dispersión y colonización de nuevos hábitats.
- ✦ La plasticidad observada en la talla de eclosión y en el tiempo total de desarrollo embrionario a distintas condiciones de temperatura, determinan que el desarrollo embrionario resulte exitoso dentro de un rango térmico similar a las fluctuaciones del agua de mar observadas en el sitio de estudio.
- ✦ Según los límites de tolerancia térmica durante el desarrollo embrionario la especie podría ampliar su rango de distribución hacia el sur a lo largo del Golfo San Jorge.
- ✦ *Pleurobranchaea maculata* presenta una amplia plasticidad en el uso de los recursos y su dieta en el nuevo hábitat está constituida por una amplia variedad de presas, incluyendo las algas.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abrantes KG, Barnett A, Bouillon S. 2014. Stable isotope-based community metrics as a tool to identify patterns in food web structure in east African estuaries. *Functional ecology*. 28(1):270-282.
- Acker P, Robert A, Bourget R, Colas B. 2014. Heterogeneity of reproductive age increases the viability of semelparous populations. *Functional Ecology*. 28(2):458-468.
- Aldana-Aranda AD, Baqueiro Cárdenas ER, Patiño-Suárez V. 2001. Descripción de las temperaturas usadas en el cultivo de larvas de *Strombus spp.* Proceedings of the 52nd Gulf and Caribbean Fisheries Institute. 52:327-339.
- Alvim J, Simone LRL, Pimenta AD. 2014. Taxonomic review of the genus *Pleurobranchaea* (Gastropoda: Pleurobrancoidea) from Brazil, with description of a new species. *Journal of Molluscan Studies*. 80(5):604-623.
- Angeloni L. 2003. Sexual selection in a simultaneous hermaphrodite with hypodermic insemination: body size, allocation to sexual roles and paternity. *Animal behaviour*. 66(3):417-426.
- Anthes N y Michiels NK. 2007. Precopulatory stabbing, hypodermic injections and unilateral copulations in a hermaphroditic sea slug. *Biology Letters*. 3(2):121-124.
- Anthes N, Schulenburg H, Michiels NK. 2008. Evolutionary links between reproductive morphology, ecology and mating behavior in opisthobranch gastropods. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 62(4):900-916.
- Audesirk TE. 1977. Chemoreception in *Aplysia californica* III. Evidence for pheromones influencing reproductive behavior. *Behavioral Biology*. 20(2):235-243.
- Bandel K. 1976. Egg masses of 27 caribbean opisthobranchs from Santa Marta, Columbia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 11(1-2):87-118.
- Barnes RD. 1969. Zoología de los invertebrados. Editorial interamericana, S.A. Segunda Edición, 294-385 pp.
- Bartholomew A. 2001. Polychaete Key for Chesapeake Bay and Coastal Virginia. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary. <https://doi.org/10.21220/V5Q319>.
- Battini N, Farias N, Giachetti CB, Schwindt E, Bortolus A. 2019. Staying ahead of invaders: using species distribution modeling to predict alien species potential niche shifts. *Marine Ecology Progress Series*. 612:127-140.
- Battle K y Nybakken J. 1998. The feeding habits of *Pleurobranchaea californica* MacFarland, 1966 (Opisthobranchia: Notaspidea) in Monterey Bay, California. *The veliger*. 41(3):213-226.

- Beninger PG, Valdizan A, Decottigies P y Cognie B. 2010. Field reproductive dynamics of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 390(2):179-187.
- Bhatia S, Garg A, Sharma K, Kumar S, Sharma A, Purohit A. 2011. Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacognosy reviews*. 5(10):138-146.
- Bigatti G, Marzinelli EM, Penchaszadeh PE. 2008. Seasonal reproduction and sexual maturity in *Odontocymbiola magellanica* (Neogastropoda, Volutidae). *Invertebrate Biology*. 127(3):314-326.
- Billig H, Chun S-Y, Eisenhauer K, Hsueh AJ. 1996. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human reproduction update*. 2(2):103-117.
- Boecklen WJ, Yarnes CT, Cook BA, James AC. 2011. On the use of stable isotopes in trophic ecology. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*. 42:411-440.
- Bond AL y Diamond AW. 2011. Recent Bayesian stable-isotope mixing models are highly sensitive to variation in discrimination factors. *Ecological Applications*. 21(4):1017-1023.
- Brante A. 2006. An alternative mechanism to reduce intracapsular hypoxia in ovicapsules of *Fusitriton oregonensis* (Gastropoda). *Marine Biology*. 149(2):269-274.
- Burtin P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry*. 2(4):498-503.
- Cancino J, Gallardo J, Torres F. 2003. Combined effects of dissolved oxygen concentration and water temperature on embryonic development and larval shell secretion in the marine snail *Chorus giganteus* (Gastropoda: Muricidae). *Marine Biology*. 142(1):133-139.
- Cancino J, Gallardo J, Torres F, Leiva G, Navarro J. 2000. Effects of sessile Protozoa on intracapsular oxygen tension and embryonic shell calcification in the muricid *Chorus giganteus*. *Marine Ecology Progress Series*. 200:141-148.
- Carefoot T, Harris M, Taylor B, Donovan D, Karentz D. 1998. Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Marine Biology*. 130(3):389-396.
- Carlton JT. 1996. Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Biological conservation*. 78(1-2):97-106.
- Carlton JT. 1999. Molluscan invasions in marine and estuarine communities. *Malacologia*. 41(2):439-454.
- Casas GN, Piriz ML, Parodi ER. 2008. Population features of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae: Laminariales) in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Journal of the Marine biological Association of the United Kingdom*. 88(1):21-28.

- Cattaneo-Vietti R, Burlando B, Senes L. 1993. Life history and diet of *Pleurobranchaea meckelii* (Opisthobranchia: Notaspidea). *Journal of molluscan studies*. 59(3):309-313.
- Chi-Hoon L, Bong-Kiun K, Young-Don L. 2011. Gonadal development and reproductive cycle of sea hare *Aplysia kurodai* in Jeju coastal waters. *Development & Reproduction*. 15(3):257-263.
- Chi-Hoon L, Bong-Kiun K, Young-Don L. 2014. Spawning behavior and egg development of *Aplysia kurodai* inhabiting the coastal waters of Jeju Island, Korea. *Development & reproduction*. 18(1):25.
- Chiken S, Kuwasawa K, Kurokawa M. 2009. A neural analysis of avoidance conditioning with the feeding attractant glycine in *Pleurobranchaea japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 154(3):333-340.
- Coleman N, Cuff W, Moverley J, Gason AS, Heislors S. 2007. Depth, sediment type, biogeography and high species richness in shallow-water benthos. *Marine and Freshwater Research*. 58(3):293-305.
- Coleman N, Gason AS, Poore GC. 1997. High species richness in the shallow marine waters of south-east Australia. *Marine Ecology Progress Series*. 154:17-26.
- Coronato F, Pessacg N, del Pilar Alvarez M. 2017. The climate of Península Valdés within a regional frame. Late Cenozoic of Península Valdés, Patagonia, Argentina. Springer. pp 85-104.
- Costello MJ. 1990. Predator feeding strategy and prey importance: a new graphical analysis. *Journal of Fish Biology*. 36:261-263.
- Cresson P, Ruitton S, Harmelin-Vivien M. 2016. Feeding strategies of co-occurring suspension feeders in an oligotrophic environment. *Food Webs*. 6:19-28.
- Cristofolini A, Merkis A, Barroso F, Vaquer Balmaceda V, Allende F, Chanique A, Koncurat M. 2013. Determinación de apoptosis por TUNEL e inmunoreactividad de las proteínas BCL-2 y BAX durante la placentación porcina. *Revista Argentina de Producción Animal*. 30(1):43-49.
- Cumplido M, Averbuj A, Bigatti G. 2010. Reproductive seasonality and oviposition induction in *Trophon geversianus* (Gastropoda: Muricidae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Journal of Shellfish Research*. 29(2):1-6.
- da Rocha RM, Moreno TR y Metri R. 2005. Ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the Arvoredo Marine Biological Reserve, Santa Catarina, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22(2):461-476.
- Dafforn KA, Glasby TM, Airoidi L, Rivero NK, Mayer-Pinto M, Johnston EL. 2015. Marine urbanization: an ecological framework for designing multifunctional artificial structures. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 13(2):82-90.

- Davies J. 1993. Aspects of the life history and physiological ecology of long-lived nudibranch molluscs. Tesis doctoral. University of St Andrews. pp 176.
- Davis WJ, Mpitsos GJ, Pinneo JM, Ram JL. 1977. Modification of the behavioral hierarchy of *Pleurobranchaea*. Journal of comparative physiology. 117(1):99-125.
- Dehnel PA y Kong DC. 1979. The effect of temperature on developmental rates in the nudibranch *Cadlina luteomarginata*. Canadian Journal of Zoology. 57(10):1835-1844.
- Dellatorre FG, Pisoni JP, Barón PJ, Rivas AL. 2012. Tide and wind forced nearshore dynamics in Nuevo Gulf (Northern Patagonia, Argentina): Potential implications for cross-shore transport. Journal of Marine Systems. 96:82-89.
- DeNiro MJ y Epstein S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et cosmochimica acta. 42(5):495-506.
- Devin S y Beisel JN. 2007. Biological and ecological characteristics of invasive species: a gammarid study. Biological invasions. 9(1):13-24.
- Domènec Ros J. 1981. Desarrollo y estrategias bionómicas en los Opisthobranchios. Oecologia Aquatica. 5(5):147-183.
- Duffy DC y Jackson S. 1986. Diet studies of seabirds: a review of methods. Colonial waterbirds. 9(1):1-17.
- Eckelbarger KJ y Blades-Eckelbarger PI. 1989. Structure of the ovotestis and evidence for heterosynthetic incorporation of yolk precursors in the oocytes of the nudibranch mollusc, *Spurilla neapolitana*. Journal of morphology. 201(2):105-118.
- Farias NE, Obenat S, Goya AB. 2015. Outbreak of a neurotoxic side-gilled sea slug (*Pleurobranchaea* sp.) in Argentinian coasts. New Zealand Journal of Zoology. 42(1):51-56.
- Farias N, Wood S, Obenat S, Schwindt E. 2016. Genetic barcoding confirms the presence of the neurotoxic sea slug *Pleurobranchaea maculata* in southwestern Atlantic coast. New Zealand Journal of Zoology. 43(3):292-298.
- Farias NE, Goya AB, Schwindt E, Obenat S, Dhanji-Rapkova M, Turner AD. 2019. The invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* is a vector of two potent neurotoxins in coasts of Argentina. Marine Biology. 166(7):82.
- Fernández M, Calderón R, Cancino JM, Jenó K. 2007. The effect of temperature on the development of encapsulated embryos of *Concholepas concholepas* along a latitudinal cline. Marine Ecology Progress Series. 348:229-237.
- Fleurence J. 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends in Food Science & Technology. 10(1):25-28.

- France R. 1995. Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series*. 124:307-312.
- Friedenberg NA, Powell JA, Ayres MP. 2007. Synchrony's double edge: transient dynamics and the Allee effect in stage structured populations. *Ecology letters*. 10(7):564-573.
- Galván D, Sweeting C, Polunin N. 2012. Methodological uncertainty in resource mixing models for generalist fishes. *Oecologia*. 169(4):1083-1093.
- García FJ, García-Gómez JC, Troncoso JS, Cervera JL. 1994. A descriptive study of some Antarctic notaspidean opisthobranchs (Gastropoda), with description of a new genus and species. *Polar Biology*. 14(4):261-268.
- Gascoigne T. 1974. A note on some sacoglossan penial styles (Gastropoda: Opisthobranchia). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 55(1):53-59.
- Gatto AJ y Yorio P. 2016. Assessing the trophic niche of South American Terns integrating conventional and isotopic methods. *Emu-Austral Ornithology*. 116(3):230-240.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*. 119(3):493-501.
- Giese AC y Pearse JS. 1974. Introduction: General Principles. En: *Reproduction of Marine Invertebrates*. Giese AC, Pearse JS (eds), Academic Press, New York. 382: 115-172.
- Gibson GD. 2003. Larval development and metamorphosis in *Pleurobranchaea maculata*, with a review of development in the Notaspidea (Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*. 205(2):121-132.
- Gibson GD y Chia F-S. 1989. Developmental variability (pelagic and benthic) in *Haminoea callidegenita* (Opisthobranchia: Cephalaspidea) is influenced by egg mass jelly. *The Biological Bulletin*. 176(2):103-110.
- Gillette R, Saeki M, Huang R-c. 1991. Defense mechanisms in notaspid snails: acid humor and evasiveness. *Journal of Experimental Biology*. 156(1):335-347.
- Goddard JH. 2004. Developmental mode in benthic opisthobranch molluscs from the northeast Pacific Ocean: feeding in a sea of plenty. *Canadian Journal of Zoology*. 82(12):1954-1968.
- Goddard JH. 2005. Ametamorphic direct development in *Dendrodoris behrensi* (Nudibranchia: Dendrodorididae), with a review of developmental mode in the family. *Proceedings of the California academy of sciences*. 56(19):201-211.
- Golikov A y Scarlato O. 1973. Method for indirectly defining optimum temperatures of inhabitancy for marine cold-blooded animals. *Marine Biology*. 20(1):1-5.

- Gosliner T. 1985. Redescription and systematic position of *Pleurobranchaea obesa* (Verrill, 1882)(Opisthobranchia: Pleurobranchaeidae). *The Veliger*. 28(1):109-114.
- Gray JS. 2002. Species richness of marine soft sediments. *Marine Ecology Progress Series*. 244:285-297.
- Gressler V, Yokoya NS, Fujii MT, Colepicolo P, Mancini Filho J, Torres RP, Pinto E. 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*. 120(2):585-590.
- Grosholz ED .1996. Contrasting rates of spread for introduced species in terrestrial and marine systems. *Ecology*. 77(6):1680–1686.
- Grosholz ED, Ruiz GM, Dean CA, Shirley KA, Maron JL, Connors PG. 2000. The impacts of a nonindigenous marine predator in a California bay. *Ecology*. 81(5):1206-1224.
- Hadfield MG y Miller SE. 1987. On developmental patterns of opisthobranchs. *American Malacological Bulletin*. 5(2):197-214.
- Harrigan JF y Alkon DL. 1978. Larval rearing, metamorphosis, growth and reproduction of the eolid nudibranch *Hermisenda crassicornis* (Eschscholtz, 1831)(Gastropoda: Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*. 154(3):430-439.
- Hasegawa M, Wilson G, Russell LD, Meistrich ML. 1997. Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiation research*. 147(4):457-467.
- Hallegraeff GM. 1998. Transport of toxic dinoflagellates via ships ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Marine Ecology Progress Series*. 168:297-309.
- Häussermann V y Försterra G. 2009. Fauna marina bentónica de la Patagonia Chilena: guía de identificación ilustrada. Santiago: Nature in Focus. pp 1000.
- Havenhand JN y Todd CD. 1988. Physiological ecology of *Adalaria proxima* (Alder et Hancock) and *Onchidoris muricata* (Müller)(Gastropoda: Nudibranchia). II. Reproduction. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 118(2):173-189.
- Havenhand JN y Todd CD. 1989. Reproductive effort of the nudibranch molluscs *Adalaria proxima* (Alder & Hancock) and *Onchidoris muricata* (Muller): an evaluation of techniques. *Functional Ecology*. 153-163.
- Hewitt J, Thrush S, Dayton P. 2008. Habitat variation, species diversity and ecological functioning in a marine system. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 366(1-2):116-122.
- Hidalgo FJ, Baron PJ, Orensanz JML. 2005. A prediction come true: the green crab invades the Patagonian coast. *Biological Invasions*. 7(3):547-552.

- Hulme PE. 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*. 46:10–18.
- Hurst A. 1967. The egg masses and veligers of thirty northeast Pacific opisthobranchs. *The veliger*. 9:255-288.
- Hoffer JNA. 2012. Quantifying Sexual Conflict in a Simultaneous Hermaphrodite. Tesis doctoral. Vrije Universiteit Amsterdam. Editores: Enschede: Ipskamp BV. pp 151.
- Hoffmeister TS, Vet LE, Biere A, Holsinger K, Filser J. 2005. Ecological and evolutionary consequences of biological invasion and habitat fragmentation. *Ecosystems*. 8(6):657-667.
- Hsueh A, Eisenhauer K, Chun S-Y, Hsu S-Y, Billig H. 1996. Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*. 51:433-455.
- Hyslop E. 1980. Stomach contents analysis- a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*. 17(4):411-429.
- Jackson AL, Inger R, Parnell AC, Bearhop S. 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER–Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*. 80(3):595-602.
- Jackson MC, Donohue I, Jackson AL, Britton JR, Harper DM, Grey J. 2012. Population-level metrics of trophic structure based on stable isotopes and their application to invasion ecology. *PloS one*. 7(2):e31757.
- Jensen KR. 1999. Copulatory behaviour in three shelled and five non-shelled sacoglossans (Mollusca, Opisthobranchia), with a discussion of the phylogenetic significance of copulatory behaviour. *Ophelia*. 51(2):93-106.
- Jerde CL, Bampfylde CJ, Lewis MA. 2009. Chance establishment for sexual, semelparous species: overcoming the Allee effect. *The American Naturalist*. 173(6): 734-746.
- Johnston EL, Piola RF y Clark GF. 2009. The role of propagule pressure in invasion success. In *Biological invasions in marine ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 133-151.
- Jones HL. 1996. The reproductive and larval ecology of the intertidal nudibranch mollusc *Adalaria proxima* (Alder & Hancock) (Gastropoda: Opisthobranchia). Tesis doctoral. University of St Andrews. pp 218 .
- Kaehler S y Kennish R. 1996. Summer and winter comparisons in the nutritional value of marine macroalgae from Hong Kong. *Botanica Marina*. 39(1-6):11-18.
- Karlsson A y Haase M. 2002. The enigmatic mating behaviour and reproduction of a simultaneous hermaphrodite, the nudibranch *Aeolidiella glauca* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Canadian Journal of Zoology*. 80(2):260-270.

- Katsanevakis S, Tempera F, Teixeira H. 2016. Mapping the impact of alien species on marine ecosystems: the Mediterranean Sea case study. *Diversity and Distributions*. 22: 694–707.
- Khor S, Wood S, Salvitti L, Taylor D, Adamson J, McNabb P, Cary S. 2014. Investigating diet as the source of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata*. *Marine drugs*. 12(1):1-16.
- Klussmann-Kolb A y Wägele H. 2001. On the fine structure of opisthobranch egg masses (Mollusca, Gastropoda). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*. 240(2):101-118.
- Knox GA. 1951. A guide to the families and genera of New Zealand polychaetes. *Tuatara*. 4:63-85.
- Koene JM y Chase R. 1998. Changes in the reproductive system of the snail *Helix aspersa* caused by mucus from the love dart. *Journal of Experimental Biology*. 201(15):2313-2319.
- Koene JM y ter Maat A. 2001. Allohormones: a class of bioactive substances favoured by sexual selection. *Journal of Comparative Physiology A*. 187(5):323-326.
- Kolar CS y Lodge DM. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution*. 16(4):199-204.
- Kurle CM, Sinclair EH, Edwards AE, Gudmundson CJ. 2011. Temporal and spatial variation in the  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values of fish and squid from Alaskan waters. *Marine Biology*. 158(11):2389-2404.
- LaForge NL y Page LR. 2007. Development in *Berthella californica* (Gastropoda: Opisthobranchia) with comparative observations on phylogenetically relevant larval characters among nudipleuran opisthobranchs. *Invertebrate Biology*. 126(4):318-334.
- Lancaster SM. 1983. The biology and reproductive ecology of *Philine aperta* (Opisthobranchia: Bullomorpha) in Oxwich Bay. *Journal of Molluscan Studies Supplement*. 12:82-88.
- Layman CA y Allgeier JE. 2012. Characterizing trophic ecology of generalist consumers: a case study of the invasive lionfish in The Bahamas. *Marine Ecology Progress Series*. 448:131-141.
- León O y Vargas O. 2009. Las especies invasoras: Un reto para la restauración ecológica. En: *Restauración Ecológica en Zonas Invasadas por Retamo Espinoso y Plantaciones Forestales de Especies Exóticas*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp 19–38.
- Leonard JL y Lukowiak K. 1991. Sex and the simultaneous hermaphrodite: testing models of male-female conflict in a sea slug, *Navanax intermis* (Opisthobranchia). *Animal Behaviour*. 41(2):255-266.

- Liang S, Liu D, Li X, Wei M, Yu X, Li Q, Ma H, Zhang Z, Qin Z. 2019. SOX2 participates in spermatogenesis of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Scientific reports. 9(1):76.
- Llodra ER. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. Advances in Marine Biology.43:8-172.
- Longley AJ y Longley RD. 1984. Mating in the gastropod mollusk *Aeolidia papillosa*: behavior and anatomy. Canadian journal of zoology. 62(1):8-14.
- Lüsis O. 1961. Postembryonic changes in the reproductive system of the *Arion after rufus* L. Proceedings of the Zoological Society of London. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. pp 433-468.
- Ma X, Ji A, Zhang Z, Yang D, Liang S, Wang Y, Qin Z. 2017. *Piwil* is essential for gametogenesis in mollusk *Chlamys farreri*. PeerJ. 5:e3412.
- Marcus E. 1973. On the genus *Bosellia* (Mollusca: Gastropoda; Ascoglossa). Bulletin of Marine Science. 23(4):811-823.
- Martinčič DŠ, Klun IV, Zorn B, Vrtovec HM. 2001. Germ cell apoptosis in the human testis. Pflügers Archiv. 442(1):159-160.
- Martynov AV y Schrödl M. 2009. The new Arctic side-gilled sea slug genus *Boreoberthella* (Gastropoda, Opisthobranchia): Pleurobrancoidean systematics and evolution revisited. Polar Biology. 32(1):53-70.
- McClellan AD. 1982. Movements and motor patterns of the buccal mass of *Pleurobranchaea* during feeding, regurgitation and rejection. Journal of Experimental Biology. 98(1):195-211.
- McDermid KJ y Stuercke B. 2003. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. Journal of Applied Phycology. 15(6):513-524.
- Medina A, García J, Moreno F, Lopez-Campos J. 1986. Comparative studies on the histology of the ovotestis in *Hypselodoris tricolor* and *Godiva banyulensis* (Gastropoda, Opisthobranchia), with special reference to yolk formation. Journal of morphology. 188(1):105-118.
- Medina A y García JC. 1987. Estudio histológico y funcional de la gónada de *Hypselodoris tricolor* (Gastropoda, Nudibranchia). Bolletino Malacológico. 23(1-4):69-82.
- Mendez MM, Schwindt E, Bortolus A, Roche A, Maggioni M, Narvarte M. 2015. Ecological impacts of the austral-most population of *Crassostrea gigas* in South America: a matter of time? Ecological Research. 30(6):979-987.
- Miranda NA y Perissinotto R. 2012. Stable isotope evidence for dietary overlap between alien and native gastropods in coastal lakes of northern KwaZulu-Natal, South Africa. PLoS One. 7(2):e31897.

- Mook DH. 1981. Effects of disturbance and initial settlement on fouling community structure. *Ecology*. 62(3):522-526.
- Moore JW y Semmens BX. 2008. Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models. *Ecology letters*. 11(5):470-480.
- Moran AL y Woods HA. 2010. Limits to diffusive O<sub>2</sub> transport: flow, form, and function in nudibranch egg masses from temperate and polar regions. *PloS one*. 5(8): e12113.
- Moran EV y Alexander JM. 2014. Evolutionary responses to global change: lessons from invasive species. *Ecology letters*. 17(5):637-649.
- Morse MP. 1984. Functional adaptations of the digestive system of the carnivorous mollusc *Pleurobranchaea californica* MacFarland, 1966. *Journal of Morphology*. 180(3):253-269.
- Muniain C, Ardila NE, Cervera JL. 2007. *Pleurobranchaea inconspicua* Bergh, 1897 (Opisthobranchia: Pleurobranchidae): redescription and distribution from Argentina and Colombia. *Bonner zoologische Beiträge*. 55:291-300.
- Nakadera Y y Koene JM. 2013. Reproductive strategies in hermaphroditic gastropods: conceptual and empirical approaches. *Canadian Journal of Zoology*. 91(6):367-381.
- Nakagawa S, Nakamura N, Fujioka M, Mori C. 1997. Spermatogenic cell apoptosis induced by mitomycin C in the mouse testis. *Toxicology and Applied pharmacology*. 147(2):204-213.
- Narahashi T. 2001. Pharmacology of tetrodotoxin. *Journal of Toxicology. Toxin Reviews*. 20. 67-84.
- Newsome SD, Martinez del Rio C, Bearhop S, Phillips DL. 2007. A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 5(8):429-436.
- O'Connor MI, Bruno JF, Gaines SD, Halpern BS, Lester SE, Kinlan BP, Weiss JM. 2007. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(4):1266-1271.
- Olden JD, Poff NL, Douglas MR, Douglas ME, Fausch KD. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution*. 19(1):18-24.
- Olive P. 1995. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. *Journal of thermal biology*. 20(1-2):79-90.
- Ottaway J. 1977. *Pleurobranchaea novaezelandiae* preying on *Actinia tenebrosa*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 11(1):125-130.

- Paiva SV, Oliveira Filho RR y Lotufo TM. 2015. Ascidians from Rocas Atoll, northeast Brazil. *Frontiers in Marine Science* 2:1-20.
- Palmer AR. 1994. Temperature sensitivity, rate of development, and time to maturity: geographic variation in laboratory reared *Nucella* and a cross-phyletic overview. In *Reproduction and Development of Marine Invertebrates*. Wilson et al. (eds). Baltimore: Johns Hopkins University Press. pp 177–194.
- Pappalardo P y Fernández M. 2014. Mode of larval development as a key factor to explain contrasting effects of temperature on species richness across oceans. *Global ecology and biogeography*. 23(1):12-23.
- Parivar K. 1978. A histological survey of gonadal development in *Arion ater* L.(Mollusca, Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*. 44(2):250-264.
- Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PloS one*. 5(3):e9672.
- Pawlik JR y Hadfield MG. 1990. A symposium on chemical factors that influence the settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: introduction and perspective. *Bulletin of Marine Science*. 46(2):450-454.
- Pearson T. 1970. The benthic ecology of Loch Linnhe and Loch Eil, a sea-loch system on the west coast of Scotland. I. The physical environment and distribution of the macrobenthic fauna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 5(1):1-34.
- Pechenik J, Chang S, Lord A. 1984. Encapsulated development of the marine prosobranch gastropod *Nucella lapillus*. *Marine Biology*. 78(2):223-229.
- Pechenik JA. 1984. The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *Journal of experimental marine biology and ecology*. 74(3):241-257.
- Pennings SC. 1991. Reproductive behavior of *Aplysia californica* Cooper: diel patterns, sexual roles and mating aggregations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 149(2):249-266.
- Pérez-Valdés M y Contreras-Guzmán R. 2016. Efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre el desarrollo temprano del nudibranchio *Diaulula punctuolata* (d'Orbigny, 1837) en condiciones de laboratorio. *Latin american journal of aquatic research*. 44(3):504-512.
- Perron FE y Corpuz GC. 1982. Costs of parental care in the gastropod *Conus pennaceus*: age-specific changes and physical constraints. *Oecologia*. 55(3):319-324.
- Phillips DL y Gregg JW. 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia*. 136(2):261-269.

- Phillips DL, Inger R, Bearhop S, Jackson AL, Moore JW, Parnell AC, Semmens BX, Ward EJ. 2014. Best practices for use of stable isotope mixing models in food-web studies. *Canadian Journal of Zoology*. 92(10):823-835.
- Phillips DL, Newsome SD, Gregg JW. 2005. Combining sources in stable isotope mixing models: alternative methods. *Oecologia*. 144(4):520-527.
- Pio MJ, Mendez M, Galván D, Bigatti G, West K, Herbert G. 2019. Does the native predator *Trophon geversianus* exert top-down control on the invasive barnacle *Balanus glandula* on Patagonian rocky shores? *Marine and Freshwater Research*. 70(11):1552-1560.
- Piriz M. 2009. Clave ilustrada para identificación de los géneros más frecuentes en Golfo Nuevo y alrededores. *Macroalgas Marinas*. Centro Nacional de la Patagonia (CENPAT). pp 31.
- Post DM. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*. 83(3):703-718.
- Przeslawski R. 2004. Chemical sunscreens in intertidal gastropod egg masses. *Invertebrate Reproduction & Development*. 46(2-3):119-124.
- Przeslawski R y Davis AR. 2007. Does spawning behavior minimize exposure to environmental stressors for encapsulated gastropod embryos on rocky shores? *Marine Biology*. 152:991–1002.
- Quezada-Romegialli C, Jackson AL, Hayden B, Kahilainen KK, Lopes C, Harrod C. 2018. Trophic position, an r package for the bayesian estimation of trophic position from consumer stable isotope ratios. *Methods in Ecology and Evolution*. 9(6):1592-1599.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ram JL, Salpeter SR, Davis WJ. 1977. Pleurobranchaea egg-laying hormone: Localization and partial purification. *Journal of comparative physiology*. 119(2):171-194.
- Rawlings TA. 1990. Associations between egg capsule morphology and predation among populations of the marine gastropod, *Nucella emarginata*. *The Biological Bulletin*. 179(3):312-325.
- Rawlings TA. 1999. Adaptations to physical stresses in the intertidal zone: the egg capsules of neogastropod molluscs. *American Zoologist*. 39(2):230-243.
- Rechimont M, Galvan D, Sueiro MC, Casas G, Piriz ML, Diez M, Primost M, Zabala MS, Marquez F, Brogger M et al. 2013. Benthic diversity and assemblage structure of a north Patagonian rocky shore: a monitoring legacy of the NaGISA project. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*. 93(8): 2049-2058

- Reid JD. 1964. The reproduction of the sacoglossan opisthobranch *Elysia maoria*. Proceedings of the Zoological Society of London. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1964. pp 365-393.
- Richmond CE, Breitbart DL, Rose KA. 2005. The role of environmental generalist species in ecosystem function. *Ecological Modelling*. 188(2-4):279-295.
- Rius M, Pineda MC, Turon X. 2009. Population dynamics and life cycle of the introduced ascidian *Microcosmus squamiger* in the Mediterranean Sea. *Biological Invasions*. 11(10):2181-2194.
- Rivas A. 1990. Heat-balance and annual variation of mean temperature in the north-patagonian gulfs. *Oceanologica Acta*. 13(3):265-272.
- Rivas A y Beier E. 1990. Temperature and salinity fields in the north patagonian gulfs. *Oceanologica acta*. 13(1):15-20.
- Rivest BR. 1984. Copulation by hypodermic injection in the nudibranchs *Palio zosterarum* and *P. dubia* (Gastropoda, Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*. 167(3):543-554.
- Rocha RM d, Zanata TB y Moreno TR. 2012. Keys for the identification of families and genera of Atlantic shallow water ascidians. *Biota Neotropica*. 12(1):269-303.
- Romero A, Novoa B, Figueras A. 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish & shellfish immunology*. 46(1):79-87.
- Ros J. 1976. Sistemas de defensa en los opistobranquios. *Oecologia aquatica*. 2(2):41-77.
- Ruiz GM, Freestone AL, Fofonoff PW, Simkanin C. 2009. Habitat distribution and heterogeneity in marine invasion dynamics: the importance of hard substrate and artificial structure. *Marine hard bottom communities*. Springer. pp 321-332.
- Ruiz M, Tarifeño E, Llanos-Rivera A, Padgett C, Campos B. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Revista de biología marina y oceanografía*. 43(1):51-61.
- Rutowski RL. 1983. Mating and egg mass production in the aeolid nudibranch *Hermisenda crassicornis* (Gastropoda: Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*. 165(1):276-285.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG. 2001. The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics*. 32(1):305-332.
- Salvitti L, Wood SA, Fairweather R, Culliford D, McNabb P, Cary SC. 2017. In situ accumulation of tetrodotoxin in non-toxic *Pleurobranchaea maculata* (Opisthobranchia). *Aquatic sciences*. 79(2):335-344.

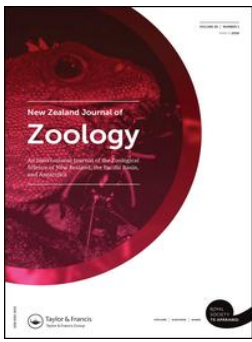
- Schmitt V, Anthes N, Michiels NK. 2007. Mating behaviour in the sea slug *Elysia timida* (Opisthobranchia, Sacoglossa): hypodermic injection, sperm transfer and balanced reciprocity. *Frontiers in Zoology*. 4(1):17.
- Schroeder P. 1987. Endogenous control of gametogenesis. *Reproduction of marine invertebrates*. Blackwell Scientific, California. pp 180-251.
- Schwindt E. 2007. The invasion of the acorn barnacle *Balanus glandula* in the southwestern Atlantic 40 years later. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 87(05):1219-1225.
- Schwindt E. 2008. Especies introducidas. Atlas de Sensibilidad Ambiental de la costa y el Mar Argentino, Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Argentina Available from: [http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt\\_04/especies.htm](http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt_04/especies.htm).
- Schwindt E, Bortolus A, Iribarne OO. 2001. Invasion of a reef-builder polychaete: direct and indirect impacts on the native benthic community structure. *Biological Invasions*. 3(2):137-149.
- Schwindt E y Bortolus A. 2017. Aquatic invasion biology research in South America: Geographic patterns, advances and perspectives. *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 20(4):322-333.
- SHN: Servicio de Hidrografía Naval. 2019. <http://www.hidro.gov.ar>. Última fecha de acceso 2019.
- Skulachev M y Skulachev V. 1999. Phenoptosis: programmed death of an organism. *Apoptosis and Beyond: The Many Ways Cells Die*. *Biochemistry (Moscow)*. 64(12):1418-1426.
- Smith JA, Mazumder D, Suthers IM, Taylor MD. 2013. To fit or not to fit: evaluating stable isotope mixing models using simulated mixing polygons. *Methods in Ecology and Evolution*. 4(7):612-618.
- Smolensky N, Romero MR, Krug PJ. 2009. Evidence for costs of mating and self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite with hypodermic insemination, the opisthobranch *Alderia willowi*. *The Biological Bulletin*. 216(2):188-199.
- Sokolove PG y McCrone EJ. 1978. Reproductive maturation in the slug, *Limax maximus*, and the effects of artificial photoperiod. *Journal of comparative physiology*. 125(4):317-325.
- Sorte CJ, Jones SJ, Miller LP. 2011. Geographic variation in temperature tolerance as an indicator of potential population responses to climate change. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 400(1-2):209-217.
- Spight TM. 1975. Factors extending gastropod embryonic development and their selective cost. *Oecologia*. 21(1):1-16.

- Sternberg R, Gooding MP, Hotchkiss AK, LeBlanc GA. 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltininduced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19:4-23.
- Strathmann RR. 1977. Egg size, larval development, and juvenile size in benthic marine invertebrates. *The American Naturalist*. 111(978):373-376.
- Strathmann RR. 1985. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. *Annual review of ecology and systematics*. 16(1):339-361.
- Strathmann RR y Strathmann MF. 1995. Oxygen supply and limits on aggregation of embryos. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 75(2):413-428.
- Taylor DI, Wood SA, McNabb P, Ogilvie S, Cornelisen C, Walker J, Khor S, Cary SC. 2015. Facilitation effects of invasive and farmed bivalves on native populations of the sea slug *Pleurobranchaea maculata*. *Marine Ecology Progress Series*. 537:39-48.
- Thompson T. 1960. Defensive adaptations in opisthobranchs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 39(1):123-134.
- Thompson T. 1966. Studies on the reproduction of *Archidoris pseudoargus* (Rapp)(Gastropoda Opisthobranchia). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 250(769):343-374.
- Thompson T. 1967. Direct development in a nudibranch, *Cadlina laevis*, with a discussion of developmental processes in Opisthobranchia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 47(1):1-22.
- Thompson LM, Faske TM, Banahene N, Grim D, Agosta SJ, Parry D, Tobin PC, Johnson DM, Grayson KL. 2017. Variation in growth and developmental responses to supraoptimal temperatures near latitudinal range limits of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.), an expanding invasive species. *Physiological entomology*. 42(2):181-190.
- Thompson T y Jarman G. 1986. Factors bearing upon egg size and embryonic period in opisthobranch molluscs. *Bolm Zoology. Universidad São Paulo*. 10: 9-18.
- Todd CD. 1979. The population ecology of *Onchidoris bilamellata* (L.)(Gastropoda: Nudibranchia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 41(3):213-255.
- Todd CD. 1983. Reproductive and trophic ecology of nudibranch molluscs. In: *The Mollusca, VI: Ecology*. Russell-Hunter WD (ed.). Academic Press, New York. 225-259.
- Todd CD y Doyle RW. 1981. Reproductive strategies of marine benthic invertebrates: a settlement-timing hypothesis. *Marine Ecology Progress Series*. 4(7):5-8.

- Todd CD y Havenhand JN. 1985. Preliminary observations on the embryonic and larval development of three dorid nudibranchs. *Journal of molluscan studies*. 51(1):97-99.
- Torchin M, Lafferty K, Kuris A. 2002. Parasites and marine invasions. *Parasitology*. 124(07):137-151.
- Trowbridge CD. 1995. Hypodermic insemination, oviposition, and embryonic development of a pool-dwelling ascoglossan. *The Veliger*. 38(3):203-211.
- Tsubokawa R y Okutani T. 1991. Early life history of *Pleurobranchaea japonica* Thiele, 1925 (Opisthobranchia: Notaspidea). *The Veliger*. 34(1):1-13.
- Tsubokawa R, Willan RC, Okutani T. 1992. Taxonomy of the two species of the Genus *Pleurobranchaea* in Japan (Gastropoda: Notaspidea: Pleurobranchidae). *Venus (Japanese Journal of Malacology)*. 50(4):249-263.
- Turner TF, Collyer ML, Krabbenhoft TJ. 2010. A general hypothesis-testing framework for stable isotope ratios in ecological studies. *Ecology*. 91(8):2227-2233.
- Underwood A. 1974. On models for reproductive strategy in marine benthic invertebrates. *The American Naturalist*. 108(964):874-878.
- Underwood AJ. 1997. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge. pp 504.
- Uriarte I, Espinoza V, Herrera M, Zúñiga O, Olivares A, Carbonell P, Pino S, Farías A, Rosas C. 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 416:168-175.
- Valdés Á. y Muniain C. 2002. Revision and taxonomic reassessment of Magellanic species assigned to *Anisodoris* Bergh, 1898 (Nudibranchia: Doridoidea). *Journal of Molluscan Studies*. 68(4):345-351.
- Vance RR. 1973. On reproductive strategies in marine benthic invertebrates. *The American Naturalist*. 107 (955):339-352.
- Wägele H y Willan RC. 2000. Phylogeny of the Nudibranchia. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 130(1):83-181.
- Walther K, Crickenberger SE, Marchant S, Marko PB, Moran AL. 2013. Thermal tolerance of larvae of *Pollicipes elegans*, a marine species with an antitropical distribution. *Marine Biology*. 160(10):2723-2732.
- Ward EJ, Semmens BX, Phillips DL, Moore JW, Bouwes N. 2011. A quantitative approach to combine sources in stable isotope mixing models. *Ecosphere*. 2(2):1-11.
- Warner RR. 1975. The adaptive significance of sequential hermaphroditism in animals. *American Naturalist*. 61-82.

- Watt JL y Aiken RB. 2003. Effect of temperature on development time in egg masses of the intertidal nudibranch, *Dendronotus frondosus* (Ascanius 1774)(Opisthobranchia, Dendronotacea). *Northeastern naturalist*. 10(1):17-25.
- Wayne NL y Block GD. 1992. Effects of photoperiod and temperature on egg-laying behavior in a marine mollusk, *Aplysia californica*. *The Biological Bulletin*. 182(1):8-14.
- Weis JS. 2010. The role of behavior in the success of invasive crustaceans. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 43(2):83-98.
- Willan RC. 1984. A review of diets in the Notaspidea (Mollusca: Opisthobranchia). *Journal of the Malacological Society of Australia*. 6(3-4):125-142.
- Willan R. 1998. Order Notaspidea. Beesley PL, Ross GJB, Wells A (eds). *Mollusca: The Southern Synthesis. Fauna of Australia .Vol 5 Editorial CSIRO: Melbourne*. pp 565-1234.
- Woods HA y Moran AL. 2008. Temperature–oxygen interactions in Antarctic nudibranch egg masses. *Journal of Experimental Biology*. 211(5):798-804.
- Yamamoto Y, Luckenbach JA, Goetz FW, Young G, Swanson P. 2011. Disruption of the salmon reproductive endocrine axis through prolonged nutritional stress: Changes in circulating hormone levels and transcripts for ovarian genes involved in steroidogenesis and apoptosis. *General and Comparative Endocrinology*. 172(3):331-343.
- Zabala S, Bigatti G, Botto F, Iribarne OO, Galván DE. 2013. Trophic relationships between a Patagonian gastropod and its epibiotic anemone revealed by using stable isotopes and direct observations. *Marine biology*. 160(4):909-919.
- Zhan A, Briski E, Bock DG, Ghabooli S y MacIsaac HJ. 2015. Ascidians as models for studying invasion success. *Marine Biology*. 162(12):2449-2470.
- Zanden MJV y Rasmussen JB. 2001. Variation in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnology and oceanography*. 46(8):2061-2066.

## **ANEXO**



## Diet of the invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* in Patagonian coastal waters

Verena Bökenhans, José E. Fernández Alfaya, Gregorio Bigatti & Andrés Averbuj

To cite this article: Verena Bökenhans, José E. Fernández Alfaya, Gregorio Bigatti & Andrés Averbuj (2018): Diet of the invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* in Patagonian coastal waters, *New Zealand Journal of Zoology*, DOI: [10.1080/03014223.2018.1464035](https://doi.org/10.1080/03014223.2018.1464035)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03014223.2018.1464035>



Published online: 02 May 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

SHORT COMMUNICATION



## Diet of the invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* in Patagonian coastal waters

Verena Bökenhans<sup>a,b</sup>, José E. Fernández Alfaya<sup>a,b</sup>, Gregorio Bigatti<sup>a,b</sup> and Andrés Averbuj<sup>a</sup>

<sup>a</sup>LARBIM - IBIOMAR. CCT CONICET-CENPAT, Puerto Madryn, Argentina; <sup>b</sup>Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Puerto Madryn, Argentina

### ABSTRACT

High densities of the invasive sea slug, *Pleurobranchaea maculata*, have been detected on the Argentinean coast, but studies on the species' adaptation have been absent until now. Stomach contents of *P. maculata* in two sampling sites located at Golfo Nuevo, Patagonia Argentina, revealed animals as a major prey, but surprisingly algae ingestion on both sampling sites was abundant. This fact was not reported in previous studies that described opportunistic carnivorous feeding habits of species belonging to the genus *Pleurobranchaea*. Significant differences in the species prey items were found between sampling sites; however, sedentary polychaetes were the main consumed group at both sites. These results are useful to understand the adaptation of this invasive species in Argentinean waters and to monitor future changes in the benthic communities colonised by *P. maculata*.

### ARTICLE HISTORY

Received 7 February 2018  
Accepted 9 April 2018

### ASSOCIATE EDITOR

Rob Cruickshank

### KEYWORDS

Algae; ecological adaptation; feeding; invasive species; prey; scavenging

## Introduction

Feeding habits of species belonging to the genus *Pleurobranchaea* have been previously reported as opportunistic carnivorous with a low feeding specificity, using a wide range of types of food (Willan 1984, 1998; Cattaneo-Vietti et al. 1993; Battle and Nybakken 1998). Such is the case of *Pleurobranchaea meckelii*, with preference for Cnidarians (Cattaneo-Vietti et al. 1993), and *Pleurobranchaea californica*, with preference for opisthobranchs (Battle and Nybakken 1998). Species including *P. meckelii*, *P. californica*, *Pleurobranchaea japonica* and *Pleurobranchaea maculata* were reported to present scavenging and cannibalistic habits (Willan 1984, 1998; Tsubokawa and Okutani 1991; Cattaneo-Vietti et al. 1993; Battle and Nybakken 1998).

*Pleurobranchaea maculata* (Quoy and Gaimard 1832) is a native New Zealand species. Since 2009, high densities of this sea slug have been described on Argentinian coasts (Farias et al. 2015, 2016). This species has a planktotrophic larval development lasting 3 weeks before settling (Gibson 2003), which could be easily dispersed through anthropogenic mechanisms such as the ballast water of trans-oceanic shipping (Carlton 1999). Many species easily break natural biogeographical barriers, which promotes species introduction into new habitats (Schwindt 2008). Invasive species may have a great impact on

natural ecosystems (Penchaszadeh et al. 2005; Mendez et al. 2015), affecting ecosystem processes (Carlton 1999; Grosholz et al. 2000; Schwindt et al. 2001; Hoffmeister et al. 2005) and ecological interactions (Hallegraeff 1998; Torchin et al. 2002), having a variety of social consequences (Schwindt 2007). *Pleurobranchaea maculata* is a voracious feeder and an active forager (Ottaway 1977) in New Zealand, where any soft-bodied invertebrates seem vulnerable to attack and ingestion (Willan 1998). Actinaria species were reported as its preferred prey item (Willan 1998), but thecate hydroids and bivalves are also consumed (Willan 1998; Taylor et al. 2015). Cannibalistic and scavenger habits were also suggested as providing possible dietary sources. Furthermore, studies suggested that *P. maculata* could be accumulating the neurotoxin tetrodotoxin through the food chain (Wood et al. 2012; Salvitti et al. 2015a). Ingestion of very low concentrations of tetrodotoxin can cause death even in adult humans (McNabb et al. 2009). This fact, together with a pH of 1 measured in the dorsal epithelium (Salvitti et al. 2015b), provide *P. maculata* with a powerful chemical defence (Gibson 2003) that may reduce possible predators, resulting in a competitive advantage against native species (Callaway et al. 2006). The presence of this sea slug on the Argentinian coast implies a potential ecological impact on the natural ecosystem. Introduced species may show voracious behaviour in a wider diversity of consumed prey in the invaded region, compared with the native habitat. Hence, study of the new feeding habits of *P. maculata* is essential to understand the effects on native biodiversity (Paine 1988; Bertness et al. 1999).

Stomach content analysis provides detailed information about most recently consumed food (Muñoz et al. 2011; Alfaya et al. 2015), as well as being a first step to understand the diet of this invasive species. Therefore, this work aimed to describe the main components of the diet of the invasive sea slug *P. maculata*, which is recently established in Golfo Nuevo, Patagonia Argentina, providing a better understanding of how invasive species are able to adapt in newly invaded habitat.

## Materials and methods

*Pleurobranchaea maculata* specimens were collected in the summer season (2016–2017) from two sampling sites: Punta Este beach (PE) and Foliás shipwreck (Fo), both sites located at Golfo Nuevo, Patagonia Argentina (42°46'S, 64°57'W), where average surface seawater temperatures range from 8 °C to 18 °C. All samplings were performed by SCUBA diving at depths ranging from 5 to 9 m. A total of 102 individuals were collected. Each individual was placed separately in a different zipper bag and taken to the laboratory. Individuals were dissected and their stomach contents were preserved in 10% seawater/formalin.

Stomach contents of 61 individuals from PE and 41 individuals from Fo were analysed. Identification of all distinguishable taxa of food items was performed under stereomicroscope and optical microscope. When necessary, stomach contents were dyed with Rose Bengal (10%) for better identification. Gastropod species identification was based on the radula, extracted and observed under optical microscope. The frequency of occurrence (O%), defined as the percentage of sea slugs containing each prey item in their stomachs, was calculated for both sites.

A chi-square test was used to compare sampling sites and to compare the algae and animal intake to parity (1:1) for each sampling site. Differences were considered significant with  $P < 0.05$ .

## Results

A wide range of prey items found in *P. maculata* stomach contents were animal prey, which represented more than 60% of the sample (Table 1). Empty stomachs representing 3.28% in PE and 12.19% in Fo were excluded from further analysis.

*Pleurobranchaea maculata* was found to consume algae on both sampling sites, representing 28.77 O% and 37.63 O% for PE and Fo sites, respectively (Figure 1). Rhodophyta and Phaeophyta were the most represented algae groups in both sampling sites (Table 1). The genus *Dictyota* (Phaeophyta) was the only algal sample to have epibiotic hydrozoan polyps.

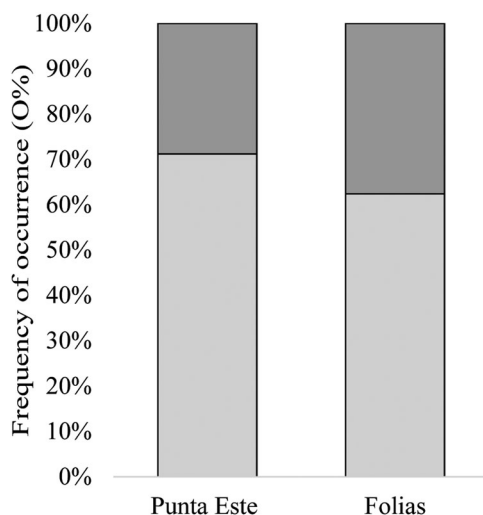
Animal prey items were significantly different between sites ( $\chi^2 = 60.34$ ,  $df = 17$ ,  $P = 9.21 \times 10^{-7}$ ). Sedentary polychaetes were the main consumed group at both sites (Table 1), with the gills and feeding tentacles of the Terebellidae family as the most prevailing item (Figure 2A–C). This item represents 25.00 O% for PE and 21.50 O% for Fo. The colonial tunicate *Diplosoma listerianum* (Figure 2D–E) was abundantly consumed and showed the most relevant difference between sites, being the second most consumed prey at PE (Table 1; PE: 22.17 O%; Fo: 7.52 O%).

Some prey items were only found in one of the sites, in a few stomach contents. At PE, an Octopodidae tentacle (*Octopus tehuelchus*) (Figure 2J), a Heteronemertine, and a cluster of unidentified fish eggs were found (Table 1). Similarly, prey items found at Fo corresponded to one cannibalistic event, a few actinarians (Figure 2G), mytilid bivalves and opisthobranchs (Table 1). This last group was represented by one nudibranch (*Doris fontainei*) (Figure 2H). Hydrozoan polyps (Figure 2F) and nematodes (Figure 2I) presented different O% in each site (Table 1).

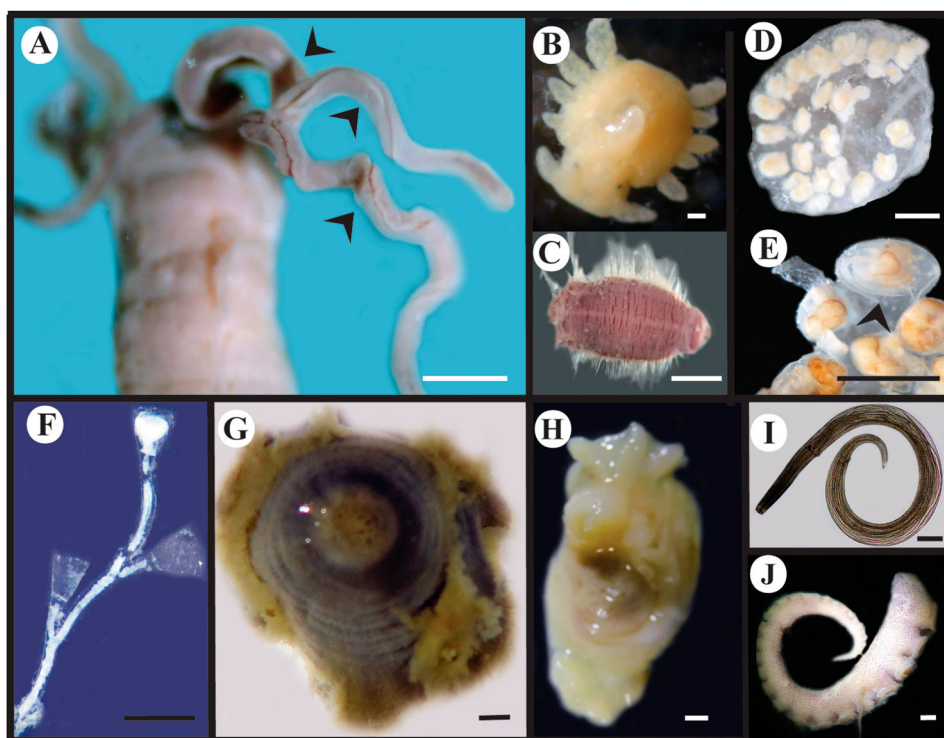
The animal : algae ingestion ratio showed significant statistical differences from parity in PE ( $\chi^2 = 38.20$ ,  $df = 1$ ,  $P = 6.36 \times 10^{-10}$ ) and in Fo ( $\chi^2 = 5.68$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.01$ ). The chi-square test showed no significant differences on the algae : animal ingestion ratio between sampling sites ( $\chi^2 = 2.35$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.12$ ).

**Table 1.** Frequency of occurrence (O%) for each prey taxon in the stomach contents of *Pleurobranchaea maculata* from both sampling sites at Golfo Nuevo, Patagonia Argentina.

Phylum	Class	Order	Species and/or specifications	O%	
				Punta Este	Folias
Porifera	Demospongiae			1.41	1.07
Nemertea	Heteronemertean			0.94	0.00
Nematoda	Nematoda			2.35	6.45
Cnidaria	Hydrozoa		Polyp stage	8.01	2.15
	Anthozoa	Actinaria		0.00	5.37
Arthropoda	Maxillopoda	Copepoda		2.83	1.07
	Malacostraca	Amphipoda		1.41	1.07
Annelida	Polychaeta		Sedentary polychaete	25.00	21.50
	Polychaeta		Errant polychaete	4.71	8.60
Mollusca	Cephalopoda	Octopoda	<i>Octopus tehuelchus</i> tentacle	0.47	0.00
	Bivalvia	Mytiloidea	Mytilidae	0.00	5.37
	Gastropoda		<i>Doris fontainei</i> (Nudibranchia)	0.00	1.07
	Gastropoda		<i>Pleurobranchaea maculata</i> (Pleurobranchomorpha)	0.00	1.07
Chordata	Ascidiacea	Enterogona	<i>Diplosoma listerianum</i>	22.17	7.52
	Vertebrata		Osteichthyes oviposition	1.88	0.00
Phaeophyta				11.32	15.05
Chlorophyta				0.94	8.60
Rhodophyta				16.50	13.97



**Figure 1.** Frequency of occurrence (O%) of animal (light grey) and algal (dark grey) items in the stomach contents of *Pleurobranchaea maculata* from both sampling sites at Golfo Nuevo, Patagonia Argentina.



**Figure 2.** Specimens found in stomach contents of *Pleurobranchaea maculata*. **A–C**, Polychaeta: **A**, Sedimentary polychaete with tentacles (arrows); **B**, Juvenile polychaete; **C**, Errant polychaete. **D–E**, Colonial tunicate *Diplosoma listerianum*: **D**, Zooids; **E**, Zooid with unhatched incubated larva (arrow); **F**, Hydrozoa; **G** Anthozoa; **H** *Doris fontainii* (Nudibranchia); **I**, Nematode; **J**, *Octopus tehuelchus* (Octopodidae) tentacle. Scale bars: **A, D–F**: 0.5 mm, **B, H**: 0.1 mm, **C, G** and **J**: 1 mm, **I**: 0.1  $\mu$ m.

## Discussion

Our results reveal that the sea slug *P. maculata* ingested animal preys as the main food item, which is similar to other findings worldwide (Willan 1998; Taylor et al. 2015). Different algal items were also included in the diet of the species, corresponding to the first records of algal ingestion for any member of the genus *Pleurobranchaea*. The high frequency of occurrence of algal items in both sampling sites reflects their importance in the diet of *P. maculata* from northern Atlantic Patagonia, consuming Rhodophyta and Phaeophyta over Chlorophyta.

Macroalgae have the potential to act as a food source (Kaehler and Kennish 2009). Considering the total amount of minerals present, lipids and soluble carbohydrate contents, phaeophytes and rhodophytes have the highest nutritional levels, whereas chlorophytes have the lowest (Fleurence 1999; McDermid and Stuercke 2003; Gressler et al. 2010). Moreover, the presence of a variety of biochemical compounds in some algae could explain the importance of ingesting algae in *P. maculata* (Burtin 2003). Some algae can synthesise UV screening compounds such as mycosporine-like amino acids (MAAs), which provide UV protection to primary and secondary consumers (Bhatia et al. 2011).

The egg masses of three species of Pleurobranchaeidae were found to contain these chemical compounds (Preslawski 2004). In particular, MAAs occur in egg masses from *P. maculata* at PE site (Soledad Zabala unpublished data). The spawn of *Aplysia dactylomela* (Opisthobranchia) adults presented double the concentration of MAAs when feeding on red algae compared with green algae (Carefoot et al. 1998). MAA richness in gastropod egg masses is diet-dependent (Carefoot et al. 1998; Preslawski 2004).

Cnidarians and opisthobranchs were described as preferred prey for species of the *Pleurobranchaea* genus (Willan 1984; Cattaneo-Vietti et al. 1993; Battle and Nybakken 1998). According to our results a large proportion of the identifiable diet of *P. maculata* in Golfo Nuevo, Argentina, is represented by sedentary polychaetes and, at a lower frequency, cnidarians, although we found hydrozoan polyps rather than actinarians. Ottaway (1977) described *P. maculata* feeding behaviour on *Actinia tenebrosa* (Anthozoa), observing that individuals graze on the anemone column. Therefore, actinarians are rarely eaten whole, probably underestimating this prey item in our results.

A variety of other invertebrates were also incorporated in the diet of *P. maculata* in the sampling sites. Differences in the ingestion of prey items between sampling sites probably reflect differences in prey availability among them.

Most species of *Pleurobranchaea* were described as carrion consumers (Willan 1984, 1998; Cattaneo-Vietti et al. 1993; Battle and Nybakken 1998). The presence of the tentacle of a highly mobile octopus in the diet supports this description. On a recent study at Hauraki Gulf (New Zealand), isotopic values ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) obtained for *P. maculata* were relatively similar to those for predatory scavengers, including four gastropod species, one decapod crustacean and one asteroidea echinoderm (Taylor et al. 2015), which also supports the presence of filter-feeding bivalves in the diet. According to Willan (1984), *P. maculata* actively attacks organisms with protective shells but fails to ingest them. Therefore, the presence of the soft tissues of Mytilidae bivalves recorded in our study is probably a consequence of its scavenging habit.

The *P. maculata* feeding habits recorded in the invaded habitat showed a wide variety of items including algae, which could be a consequence of adaptation to the new

environment. Our results could help in monitoring future changes in the invaded benthic communities. The presence of neurotoxicity in specimens invading the coasts of Argentina appears as a potential risk to vertebrates (including humans). Hence, the capacity to accumulate tetrodotoxin, presumably incorporated through their diet, should be monitored in further studies. *Pleurobranchaea maculata* appears to be establishing successfully in this new habitat, which could endanger native species, causing a negative effect on biodiversity.

## Acknowledgements

The authors are members of CONICET. This is publication #100 of the Laboratorio de Reproducción y Biología Integrativa de Invertebrados Marinos (LARBIM). This research was partially supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 0833, 2709, 0174 and 1476). All research work including sampling and laboratory investigations complies with current Argentine laws. We are grateful to Facundo Irigoyen, Nestor Ortiz, Ricardo Vera, Julio Rua and Andres Morales (CCT CONICET-CENPAT).

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This research was partially supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 0833, 2709, 0174 and 1476).

## ORCID

Andrés Averbuj  <http://orcid.org/0000-0003-2416-2007>

## References

- Alfaya JE, Galván DE, Machordom A, Penchaszadeh PE, Bigatti G. 2015. *Malacobdella arrokeana*: parasite or commensal of the giant clam *Panopea abbreviata*? Zoological Science. 32(6):523–530.
- Battle K, Nybakken J. 1998. The feeding habits of *Pleurobranchaea californica* MacFarland, 1966 (Opisthobranchia: Notaspidea) in Monterey Bay, California. The Veliger. 41(3):213–226.
- Bertness MD, Leonard GH, Levine JM, Schmidt PR, Ingraham AO. 1999. Testing the relative contribution of positive and negative interactions in rocky intertidal communities. Ecology. 80(8):2711–2726.
- Bhatia S, Garg A, Sharma K, Kumar S, Sharma A, Purohit A. 2011. Mycosporine and mycosporine-like amino acids: a paramount tool against ultra violet irradiation. Pharmacognosy Reviews. 5(10):138–146.
- Burtin P. 2003. Nutritional value of seaweeds. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2(4):498–503.
- Callaway RM, Miao S, Guo Q. 2006. Are trans-pacific invasions the new wave? Biological Invasions. 8(7):1435–1437.
- Carefoot T, Harris M, Taylor B, Donovan D, Karentz D. 1998. Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. Marine Biology. 130(3):389–396.
- Carlton JT. 1999. Molluscan invasions in marine and estuarine communities. Malacologia. 41(2):439–454.

- Cattaneo-Vietti R, Burlando B, Senes L. 1993. Life history and diet of *Pleurobranchaea meckelii* (Opisthobranchia: Notaspidea). *Journal of Molluscan Studies*. 59(3):309–313.
- Farias N, Wood S, Obenat S, Schwindt E. 2016. Genetic barcoding confirms the presence of the neurotoxic sea slug *Pleurobranchaea maculata* in southwestern Atlantic coast. *New Zealand Journal of Zoology*. 43(3):292–298.
- Farias NE, Obenat S, Goya AB. 2015. Outbreak of a neurotoxic side-gilled sea slug (*pleurobranchaea* sp.) in argentinian coasts. *New Zealand Journal of Zoology*. 42(1):51–56.
- Flurence J. 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*. 10(1):25–28.
- Gibson GD. 2003. Larval development and metamorphosis in *Pleurobranchaea maculata*, with a review of development in the Notaspidea (Opisthobranchia). *The Biological Bulletin*. 205(2):121–132.
- Gressler V, Yokoya NS, Fujii MT, Colepico P, Mancini Filho J, Torres RP, Pinto E. 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*. 120(2):585–590.
- Grosholz ED, Ruiz GM, Dean CA, Shirley KA, Maron JL, Connors PG. 2000. The impacts of a non-indigenous marine predator in a California bay. *Ecology*. 81(5):1206–1224.
- Hallegraeff GM. 1998. Transport of toxic dinoflagellates via ships ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Marine Ecology Progress Series*. 168:297–309.
- Hoffmeister TS, Vet LE, Biere A, Holsinger K, Filser J. 2005. Ecological and evolutionary consequences of biological invasion and habitat fragmentation. *Ecosystems*. 8(6):657–667.
- Kaehler S, Kennish R. 2009. Summer and winter comparisons in the nutritional value of marine macroalgae from Hong Kong. *Botanica Marina*. 39(1–6):11–18.
- McDermid KJ, Stuercke B. 2003. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 15(6):513–524.
- McNabb P, Mackenzie L, Selwood A, Rhodes L, Taylor D, Cornelison C. 2009. Review of tetrodotoxins in the sea slug *Pleurobranchaea maculata* and coincidence of dog deaths along Auckland Beaches. Prepared by Cawthron Institute for the Auckland Regional Council. Auckland Regional Council Technical Report 2009/ 108.
- Mendez MM, Schwindt E, Bortolus A, Roche A, Maggioni M, Narvarte M. 2015. Ecological impacts of the austral-most population of *Crassostrea gigas* in South America: a matter of time? *Ecological Research*. 30(6):979–987.
- Muñoz RC, Currin CA, Whitfield PE. 2011. Diet of invasive lionfish on hard bottom reefs of the southeast USA: insights from stomach contents and stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series*. 432:181–193.
- Ottaway J. 1977. *Pleurobranchaea novaezelandiae* preying on *Actinia tenebrosa*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 11(1):125–130.
- Penchaszadeh PE, Boltovskoy D, Borges M, Cataldo D, Damborenea C, Darrigran G, Sylvester F. 2005. Invasores. Invertebrados exóticos en el Río de la Plata y región marina alemana [Exotic invertebrates in the Río de la Plata and surrounding marine region]. Buenos Aires: Eudeba; 377 p.
- Paine RT. 1988. Road maps of interactions or grist for theoretical development? *Ecology*. 69(6):1648–1654.
- Preslawski R. 2004. Chemical sunscreens in intertidal gastropod egg masses. *Invertebrate Reproduction & Development*. 46(2–3):119–124.
- Salvitti L, Wood SA, Taylor DI, McNabb P, Cary SC. 2015a. First identification of tetrodotoxin (TTX) in the flatworm *Stylochoplana* sp.: a source of TTX for the sea slug *Pleurobranchaea maculata*. *Toxicon*. 95:23–29.
- Salvitti LR, Wood SA, Winsor L, Cary SC. 2015b. Intracellular immunohistochemical detection of tetrodotoxin in *Pleurobranchaea maculata* (gastropoda) and *Stylochoplana* sp.(turbellaria). *Marine Drugs*. 13(2):756–769.
- Schwindt E. 2007. The invasion of the acorn barnacle *Balanus glandula* in the south-western Atlantic 40 years later. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 87(05):1219–1225.

- Schwindt E. 2008. Especies introducidas. Atlas de Sensibilidad Ambiental de la costa y el Mar Argentino. [Introduced species. Atlas of environmental sensitivity of the Argentine coast and sea]. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Argentina. [accessed 2017 Jun 28]. [http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt\\_04/especies.htm](http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt_04/especies.htm).
- Schwindt E, Bortolus A, Iribarne OO. 2001. Invasion of a reef-builder polychaete: direct and indirect impacts on the native benthic community structure. *Biological Invasions*. 3(2):137–149.
- Taylor DI, Wood SA, McNabb P, Ogilvie S, Cornelisen C, Walker J, Khor S, Cary SC. 2015. Facilitation effects of invasive and farmed bivalves on native populations of the sea slug *Pleurobranchaea maculata*. *Marine Ecology Progress Series*. 537:39–48.
- Torchin M, Lafferty K, Kuris A. 2002. Parasites and marine invasions. *Parasitology*. 124(7):137–151.
- Tsubokawa R, Okutani T. 1991. Early life history of *Pleurobranchaea japonica* Thiele, 1925 (Opisthobranchia: Notaspidea). *The Veliger*. 34(1):1–13.
- Willan RC. 1984. A review of diets in the Notaspidea (Mollusca: Opisthobranchia). *Journal of the Malacological Society of Australia*. 6(3–4):125–142.
- Willan RC. 1998. Class opisthobranchia. order notaspidean. In: Beesley PL, Ross GJB, Wells A, editors. *Mollusca: the southern synthesis. Fauna al Australia*. Vol. 5; Part A. Melbourne: CSIRO Publishing; p. 277–280.
- Wood SA, Casas M, Taylor DI, McNabb P, Salvitti L, Ogilvie S, Cary SC. 2012. Depuration of tetrodotoxin and changes in bacterial communities in *Pleurobranchaea maculata* adults and egg masses maintained in captivity. *Journal of Chemical Ecology*. 38(11):1342–1350.