

VCH-FC
MAG-B
M445
C.1



**Estrategia de reproducción en la Antártica:
Estacionalidad reproductiva y Patrón de
apareamiento en el erizo incubante, *Abatus agassizii*
(Mortensen 1910)**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Ecología y Biología
Evolutiva**

Facultad De Ciencias

Claudia Soledad Maturana Bobadilla

Noviembre, 2011

Director de Tesis Dr: Elie Poulin

Co-Director: Dr. Jean Pierre Féral



"Hemos querido reemplazar el amor por el conocimiento como guía en nuestro quehacer y en nuestras relaciones con otros seres humanos y con la naturaleza toda, y nos hemos equivocado"

*Humberto Maturana
"De máquinas y seres vivos"*



Claudia, es la hija menor de Nelson y Angélica provenientes de Sewell, un campamento minero en plena cordillera de los Andes. Junto a sus tres hermanas compartió una hermosa infancia, recorriendo desde Concepción hasta Antofagasta, donde conoció a grandes personajes y compartió junto a ellos experiencias que remecieron su vida. Sencilla y con una sonrisa eterna en el alma, amante de la música y la naturaleza la cual despertó interrogantes que se transformaron en un sueño, que ahora cumple con pasión y entrega.

Tras la exploración de motivaciones académicas y una serie de estadías en laboratorios, llegó donde el Dr. Poulin quien abrió sus puertas al conocimiento de la Antártica, donde Claudia pudo encausar un satisfactorio magíster e inolvidables experiencias de vida en aquél distante lugar.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo parte desde una serie de iniciativas personales, académicas y económicas, se sostiene por múltiples pilares de amistad y familiar y culmina tras una serie de experiencias y procesos personales.

Desde la iniciativa académica, este trabajo parte gracias al Dr. Elie Poulin, persona que partió siendo mi profesor, se transformó en mi tutor quien desarrolló un excelente trabajo como guía de esta tesis y que se fue convirtiendo en un amigo sin precedentes y que hoy culmina como uno de mis mentores y formadores. Agradezco enormemente su calidad de trabajo y disponibilidad eterna, así como también su especial sentido del humor y eterna sonrisa. Asimismo, quisiera agradecer a los miembros de la comisión a la Dra. Miriam Fernández y al Dr. David Véliz, por sus importantes acotaciones y correcciones, excelentes sugerencias y comentarios que encausaron este trabajo a un mejor resultado.

Desde la iniciativa económica, agradezco al Instituto de Ecología y Biodiversidad, en especial al proyecto basal PFB-23 e iniciativa milenio ICM P05-002, por facilitar el financiamiento de mi tesis, aportar al crecimiento profesional y auspiciar grandes experiencias en el exterior e interior del país. Al Instituto

Antártico Chileno, en especial al programa de becas de financiamiento de tesis, por financiar parte de mi trabajo y una de las experiencias más inolvidables que he vivido, visitar la Antártica. Gracias al apoyo logístico de la INACH y a todos los que de una u otra forma aportan al desarrollo de las ciencias antárticas.

Asimismo, no hay iniciativa que no necesite un pilar humano, y son aquellos que me acompañaron durante este trabajo, quienes persistentemente me impulsaron a seguir en la tarea de la investigación. Agradezco a mis queridos amigos de laboratorio quienes con sus peculiares formas de ser y estar ofrecieron siempre su cálida ayuda y sabios consejos. En especial a aquellos con quienes compartí viajes y carretes, Angie, Andrea, Constanza y María José, por esas fabulosas conversaciones con gran contenido y otras que no tanto. A la Fabi, Jimenilla y Karin, por su compañía, amistad e incondicional ayuda. A Chris, Ceci y Claudio por su gran disponibilidad a escuchar y por esos consejos que siempre fueron bien recibidos y de los cuales aprendí demasiado. Y de quienes, desde la incipiente curiosidad de pregrado recorrieron junto a mí este camino: a Mariela, Javiera quienes con su compañía hicieron que no perdiera mi eterna capacidad de reír y disfrutar simples y bellos momentos, y Caroline que desde la distancia siempre ha tenido mucha confianza en mí y me ha dado ánimo para seguir adelante. A Santi, Paula, Gioco, Cloa, Isa, Claudio, Daniel, Nachín y Marioli que

reconocían mi pasión y entrega en lo que hago y continuamente me entregaron las mejores vibras y los mejores recuerdos. Y por supuesto, a mi familia y su eterno cobijo, ya que fueron los que estuvieron tras las experiencias y procesos personales, esas tres personitas que aprendieron desde la lejanía de sus actividades, que significaba la ciencia y la Antártica para mí. Esas personitas que siempre celebraron mis logros y evaluaban mis fracasos, que con una simple conversación podían despejar todas mis dudas y llenarme de motivación y tranquilidad. Y en especial a la pastelito de fresa, cuya sonrisa e inocencia me hacían dejar todo de lado para imaginar escenarios fantásticos y querer recorrerlos junto a ella.

ÍNDICE DE MATERIAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION GENERAL	5
CAPITULO I: Estacionalidad y calendarización de los ciclos reproductivos en <i>A. agassizii</i>	
- INTRODUCCION	16
- MATERIALES Y MÉTODOS	29
- RESULTADOS	45
- DISCUSION	69
CAPITULO II: Patrón de apareamiento y multipaternidad en <i>A. agassizii</i>	
- INTRODUCCION	78
- MATERIALES Y MÉTODOS	90
- RESULTADOS	103
- DISCUSION	119
CONCLUSIONES FINALES	128
BIBLIOGRAFÍA	131
APÉNDICES	168

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO I

Tabla I-1.- Resumen de los distintos tipos de ciclo reproductivo que se pueden identificar en tres distintos niveles	18
Tabla I-2.- Resumen de la caracterización de los individuos del sitio de estudio de <i>A. agassizii</i> . H: Hembras; M: Machos; DS: Desviación estándar	48
Tabla I-3.- Resumen de promedios de abundancia (\bar{X}) y de proporciones por madre ($E_i/Total$) de los diferentes estadios del desarrollo de <i>A. agassizii</i> reportados durante los cuatro años de muestreo	52
Tabla I-4.- Resumen de los valores de significancia (p value) de las pruebas de permutación, realizadas para la comparación entre el número de crías por bolsillo	54

CAPITULO II

Tabla II-1.- Resumen de los principales modos de liberación de gametos de macho y hembras y su asociación en invertebrados marinos.	81
Tabla II-2.- Resumen de los 6 loci más polimórficos utilizados en este estudio. SSR: (Short Sequence Repeat) motivo de repetición; pb: pares de bases	106

Tabla II-3.- Resumen de la diversidad genética encontrada en población de <i>A. agassizii</i> en Isla Rey Jorge, Islas Shetlands. NA: Número promedio de alelos; PIC: Contenido de información polimórfica; Ho: Heterocigocidad observada; He: Heterocigocidad esperada. Fis según Weir & Cockerham (1984); (*) valor de $p < 0.05$, (**) valor de $p < 0.01$, (***) valor de $p < 0.001$.	107
Tabla II-4.- Resumen de los principales resultados encontrados en los análisis de multipaternidad realizado a una cohorte (E4) en 8 hembras evaluadas	111
Tabla II-5a.-Posibles genotipos con el mayor valor de likelihood encontrados para los padres putativos de la camada en la madre 5 (M5). Alelos en cursiva serían los alelos entregados por la madre; alelos en negrita serían los alelos los entregados por el padre	112
Tabla II-5b.- Otros posibles genotipos de los padres putativos para la camada de M5 ordenado de forma descendente según su valor de likelihood	112
Tabla II-6.- Resumen de los principales resultados obtenidos por el programa CERVUS v3.0.3 para los análisis de asignación de paternidad. ID: Identidad de las crías; PNE: Probabilidad de No-Excluir a un padre candidato no emparentado conociendo a la madre; LOD: El valor de la razón del logaritmo de verosimilitud (log likelihood ratio) entre el padre candidato y la cría (dúo) y entre la madre, padre candidato y la cría (trío); -: sin asignación; (+): 80% de confianza; *: 95% de confianza:	115
Tabla II-7.- Resumen de los principales resultados encontrados en los análisis de multipaternidad realizado a dos cohortes distintas en 4 hembras muestreadas durante la campaña 2011.	116

Tabla II-8.- Genotipos encontrados en la madre BT33 y su correspondiente camada con dos cohortes (G: E1; J: E4). *: posible presencia de alelo nulo; **: incongruencia. Los individuos en negrita y cursiva son aquellos que fueron incluidos en el análisis.

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION GENERAL

- Figura 1.- Clasificación multifactorial de los distintos patrones de desarrollo en invertebrados marinos. Figura extraída de *Poulin et al.* 2001. 6
- Figura 2.- Distribución geográfica y batimétrica de *Abatus agassizii* (Mortensen 1910). La escala batimétrica (derecha) indica el rango de profundidad total de la especie (flechas y números a lo largo de la escala). Los números dentro de la escala indican la ocurrencia de la especie en el rango. 12

CAPITULO I

- Figura I-1.- Diagrama esquemático de un ciclo reproductivo a nivel de individuo. 17
- Figura I-2a.- Mapa de Islas Shetlands en el continente antártico. Región en rojo señala Isla Rey Jorge, lugar donde se ubica Bahía Fildes (recuadro negro) 30
- Figura I-2b.- Fotografía Satelital de Península Fildes en Isla Rey Jorge, Islas Shetland. En círculo en rojo representa la Bahía Fildes. (Fotografía gentileza de Dirck Schories). 30
- Figura I-3.- Morfología de dos Schizasteridae incubantes en Bahía Fildes. Der: *A. agassizii*, Izq: *T. abatoides* 32
- Figura I-4.- Fotografía aérea de Bahía Fildes e Isla Ardley. Isla Rey Jorge, Antártica. Los círculos señalan los sitio de estudio de *Abatus agassizii*, en rojo: Península Ardley (PAr); en amarillo:

Playa de Base China (BCh). (Fotografía gentileza de Dirck Schories)	33
Figura I-5.- Medición de individuos de <i>A. agassizii</i> utilizando un pie de metro en laboratorio de Base Científica Chilena “Prof. Julio Escudero” en la Isla Rey Jorge.	35
Figura I-6.- Sistema de Lovén (1982) en la denominación de placas en un erizo regular. (Fotografía extraída del libro ANTARCTIC ECHINOIDEA David <i>et al.</i> 2005 Pág. 33)	37
Figura I-7.- Esquema del ciclo de desarrollo de <i>A. cordatus</i> . (Fotografía tomada del artículo de Schatt & Féral, 1996).	40
Figura I-8.- Identificación de individuos adultos entre machos (derecha) y hembras (izquierda) según el desarrollo de marsupios incubantes dorsales.	46
Figura I-9.- Distribución de frecuencia de tamaños de testa (TL) de los individuos de <i>A. agassizii</i> , muestreados durante todas las campañas de terreno (2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2011).	47
Figura I-10.- Relación entre tamaño de testa de la madre en mm (TL) y el número de crías incubadas (TC)	49
Figura I-11.- Estadíos de desarrollo de <i>A. agassizii</i> . Fila Superior. Izquierda: Blástula-Gástrula (E1), Derecha: Postgástrulas (E2). Fila Inferior, Izquierda: Juvenil I (E3), Derecha: Juvenil II.	51
Figura I-12.- Gráfico de las proporciones promedio de los diferentes estadíos para los 4 años de medición en <i>A. agassizii</i> de Península Ardley (PAr). Las barras verticales indican la desviación estándar de cada estadío.	52
Figura I-13. Distribución de crías en los bolsillos incubantes. Los números dentro de cada bolsillo indica promedio de crías (\pm DS, N= 111).	54

Figura I-14.- Comparación entre proporciones de los diferentes estadios del desarrollo por madre en los cuatro años de estudio. Las barras son intervalos de confianza del 95%	56
Figura I-15.- Diferencias interanuales de las proporciones de los distintos estadios del desarrollo en <i>A. agassizii</i> . Las barras verticales son intervalos de confianza del 95%.	57
Figura I-16.- Resumen de Test de Tukey desigual N HSD. Cuadros rojos contienen valores significativos. **= 0.001; ***= 0.0001; ****= 0.00001	58
Figura I-17.- Proporciones de los diferentes estadios del desarrollo en sitio Base China (BCh) y Península Ardley (PAr). Las barras verticales indican la desviación estándar de cada estadio.	59
Figura I-18.- Diferencias entre proporciones de los diferentes estadios del desarrollo por madre en <i>A. agassizii</i> en Playa de Base China (BCh). Las barras son intervalos de confianza del 95%	60
Figura I-19.- Comparación de los diferentes estadios del desarrollo entre los dos sitios de muestreo durante la campaña del 2011 (Base China: BCh y Península Ardley: PAr). ($F_{(3,80)}$; $p=0,5598$). Las barras verticales son intervalos de confianza del 95%.	61
Figura I-20.- Proporciones de los diferentes estadios del desarrollo entre <i>T. abatooides</i> y <i>A. agassizii</i> en el sitio Base China (BCh) durante la campaña del año 2011. Las barras verticales indican la desviación estándar de cada estadio.	62
Figura I-21.- Proporciones de los diferentes estadios del desarrollo por madre en <i>T. abatooides</i> . Las barras son intervalos de confianza del 95%	63

Figura I-22.- Comparación de los diferentes estadios del desarrollo entre especies en el mismo sitio de muestreo durante la campaña del 2011. ($F_{(3,44)} = 9.1811$; $p=0.00008$)	64
Figura I-23.- Calendarización de los dos ciclos reproductivos de <i>A. agassizii</i> en los diferentes años muestreados. Muestreo 2008: 01/02; Muestreo 2009: 20/01; Muestreo 2010: 01/02; Muestreo 2011: 14/01	66
Figura I-24.- Calendarización de los dos ciclos reproductivos de <i>A. agassizii</i> y <i>T. abatoides</i> . Se muestran las comparaciones entre sitio de muestreo (PAr vs BCh) durante la campaña del 2011 y entre especies en el mismo sitio BCh. El muestreo fue realizado el día 14 de enero.	68
Figura I-25.- Representación gráfica de las variaciones en la temperatura de la superficie del agua registradas durante febrero 2008 y febrero 2010.	73
Figura I-26.- Reconstrucción filogenética de la familia Schizasteridae realizada a partir del ADN mitocondrial (COI). Cuadro en verde: Especies Subantárticas; Cuadro en rojo: Especies Antárticas.	75

CAPITULO II

Figura II-1.- Punto de muestreo en Península Ardley frente a Bahía Fildes, Isla Rey Jorge	90
Figura II-2.- (a) Esquema de la metodología utilizada para realizar el muestreo en terreno (b) Esquema del transecto utilizado y las profundidades registradas en sus extremos (c) Esquema de un cuadrante y sus dimensiones con ejemplos de algunos individuos encontrados.	92

Figura II-3.- Fotografías submarinas del muestreo. Arriba: cuadrante dispuesto en el sustrato con cordel de medición. Abajo Derecha: cuadrante con individuos de <i>A. agassizii</i> en una de sus celdas. Abajo Izquierda: extracción de un individuo dentro del cuadrante.	93
Figura II-4.- Representación gráfica de la distribución de los individuos a lo largo del transecto de 20m. Las celdas naranja indican presencia de individuos (juveniles, machos y hembras).	103
Figura- II-5.- Distribución de densidad en cada cuadrante dentro del transecto. Se distinguen los dos escenarios con densidades significativamente diferentes.	104
Figura II-6.- Probabilidad de Identidad (PI) para cada locus y la combinación de los 6 loci. "PI Fildes": probabilidad de identidad en población evaluada. "PI emparentados": probabilidad de identidad en la población asumiendo individuos emparentados entre sí.	108
Figura II-7.- Representación gráfica del test de mantel utilizando la distancia geográfica de los individuos adultos (d) y el coeficiente de parentesco (r).	109
Figura II-8.- Correlación entre la distancia geográfica y coeficiente de parentesco promedio entre cuadrantes muestreados	110
Figura II-9.- Representación gráfica del número de padres por camada a lo largo del transecto. Eje X: madres evaluadas. Eje Y: Número de machos encontrados por el programa Gerud2	113
Figura II-10.- Probabilidad de Exclusión (PE) para cada locus y la combinación creciente de los 6 loci utilizados.	114
Figura II-11.- Porcentaje de fertilización a varias concentraciones limitantes de esperma en organismos del tipo "broadcaster" (triángulos; <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> , Levitan 1993), y del	

tipo “spermcaster” (cuadrados: briozoo; círculos: ascidia colonial. Flecha recta: indica la concentración a la cual la esperma se vuelve limitante. Flecha curva: indica la concentración del 50% de fertilización máxima. (negras: erizo; blancas: briozoo, gris: ascidia. (Imagen tomada de Pemberton *et al.* 2003, pág 224)

122

Figura II-12.- Fotografías de la morfología ventral de *A. agassizii*, se observa la estructura de la boca.

124

Figura II-13.- Gráfica de los coeficientes de parentesco entre adultos de la población de *A. agassizii* en Bahía Fildes.

125

RESUMEN

Aún cuando la Planctotrofia se establece como el modo de desarrollo más conspicuo entre los invertebrados marinos, la incubación está presente en la mayoría de los sistemas marinos. En particular, la Antártica es la única región del mundo que exhibe una alta proporción de especies incubantes en comparación con otros modos de desarrollo.

El erizo incubante *Abatus agassizii*, presenta una distribución Antártica y Subantártica. En particular, la población de estudio se encuentra en la Isla Rey Jorge, Islas Shetland del Sur. Se ha documentado que esta zona – a diferencia de lo observado en otras regiones antárticas – presenta importantes variaciones en su escenario ambiental, escenario similar a lo encontrado en zonas subantárticas. Con el objetivo de evaluar la reproducción de esta especie antártica, se realizó la determinación de la estacionalidad reproductiva siguiendo el ciclo reproductivo e incubación de su especie hermana *A. cordatus* y una datación estimada de los eventos reproductivos. Los resultados señalan que *A. agassizii*, presenta un ciclo reproductivo con dos pulsos en el año (Julio y Diciembre) en sincronía. Estos resultados se asemejan a lo observado en las especies subantárticas *A. cordatus* y *A. cavernosus*. Esto podría deberse a: 1) la importante fluctuación ambiental de

las Islas Shetland del Sur generarían una ciclicidad en la reproducción de *A. agassizii*. 2) una inercia filogenética en el establecimiento de los ciclos reproductivos como carácter, ya que la filogenia de máxima parsimonia posiciona a *A. agassizii*, *A. cavernosus* y *A. cordatus* en un solo clado.

Al igual que la mayoría de las especies incubantes con reproducción de tipo "spermcast" (*i.e* retención de gametos por parte de las hembras, el macho es el único que libera sus gametos a la columna de agua), *A. agassizii* presenta una retención de gametos femeninos y de sus crías en el interior de bolsillos incubantes. Con el objetivo de conocer el sistema de apareamiento y nivel de multipaternidad de la especie *A. agassizii*, se realizó un análisis de parentesco y evaluó la diversidad genética de la población basado en 66 individuos adultos usando 6 microsatélites polimórficos. La heterocigosidad fue de 0.623 con un déficit de heterocigotos global (Fis 0.124, $p < 0.001$), causado principalmente por presencia de alelo nulo en uno de los locus. Se encontró que esta especie presenta un sistema poliándrico con multipaternidad moderada, y que – a pesar de la retención de gametos y crías por parte de la hembra – las estrategias reproductivas desarrolladas por esta especie, evitaría la generación de estructuras familiares a pequeña escala, eludiendo los efectos de la endogamia.

ABSTRACT

Even if planktotrophy is the most conspicuous development mode among marine invertebrates, brooding is found over all marine systems. In particular in Antarctic echinoderms, brooding is the dominant mode of reproduction.

The brooding sea urchin, *Abatus agassizii* has an Antarctic and Subantarctic distribution. The unique population of *A. agassizii* studied so far occurs in King George Island, South Shetland. In contrast with other Antarctic continental regions, this area presents a high environmental seasonality very similar to that encountered in subantarctic regions. Here, we investigated the occurrence of a reproductive cycle in an Antarctic species, which experiences a strong seasonality. The results indicated that *A. agassizii* has a reproductive cycle with two spawning events per year (July and December) with synchrony among females. These results are congruent with the reproductive cycle of the subantarctic species *A. cordatus* and *A. cavernosus*. This cyclic pattern 1) could have been induced by the strong environmental seasonality in the South Shetland Islands or 2) may be a conserved character shared with subantarctic

species, given that the sequence polymorphism of the mitochondrial COI gene groups *A. agassizii*, *A. cavernosus* and *A. cordatus* in a single clade.

Like others brooding species with spermcast (*i.e* females retains its gametes, only the male is free-spawner), *A. agassizii* retains their eggs and broods their youngs in dorsal pouches. In order to study the mating system and multipaternity level in this species, we performed parentage analyses and evaluated the genetic diversity among 66 adults using 6 polymorphic microsatellites. The heterozygosity reached 0.623 and a global heterozygote deficiency was found in the population (Fis 0.124, $p < 0.001$), mainly caused by the presence of null alleles at one locus. *Abatus agassizii* resulted to present a polyandry system with moderate level of multipaternity.

Finally, despite the retention of eggs and brooding of youngs by the female, the reproductive strategy of this species tend to avoid the effect of kinship at micro-scale, maintaining panmixia in the population.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Varios han sido los intentos por clasificar la alta variedad de modos de desarrollo y reproducción que despliegan los invertebrados marinos bentónicos. Algunos autores han descrito clasificaciones basadas en la combinación de factores embriológicos, es decir si presentan desarrollo directo o indirecto y factores ecológicos como patrón de alimentación y hábitat (McEdward 1997, Gillespie & McClintock 2007). Sin embargo este tipo de clasificaciones tradicionales no cubren la diversidad y peculiaridad de los grupos de invertebrados marinos bentónicos (Poulin *et al.* 2001).

Poulin y colaboradores (2001) plantearon un esquema de clasificación multifactorial (Fig. 1), que logró representar esta diversidad en los patrones del desarrollo en invertebrados marinos. Esta clasificación está centrada en tres factores ecológicos: alimentación (endotrofia/exotrofia), hábitat (pelágico/béntico) y desarrollo (protegido/libre).

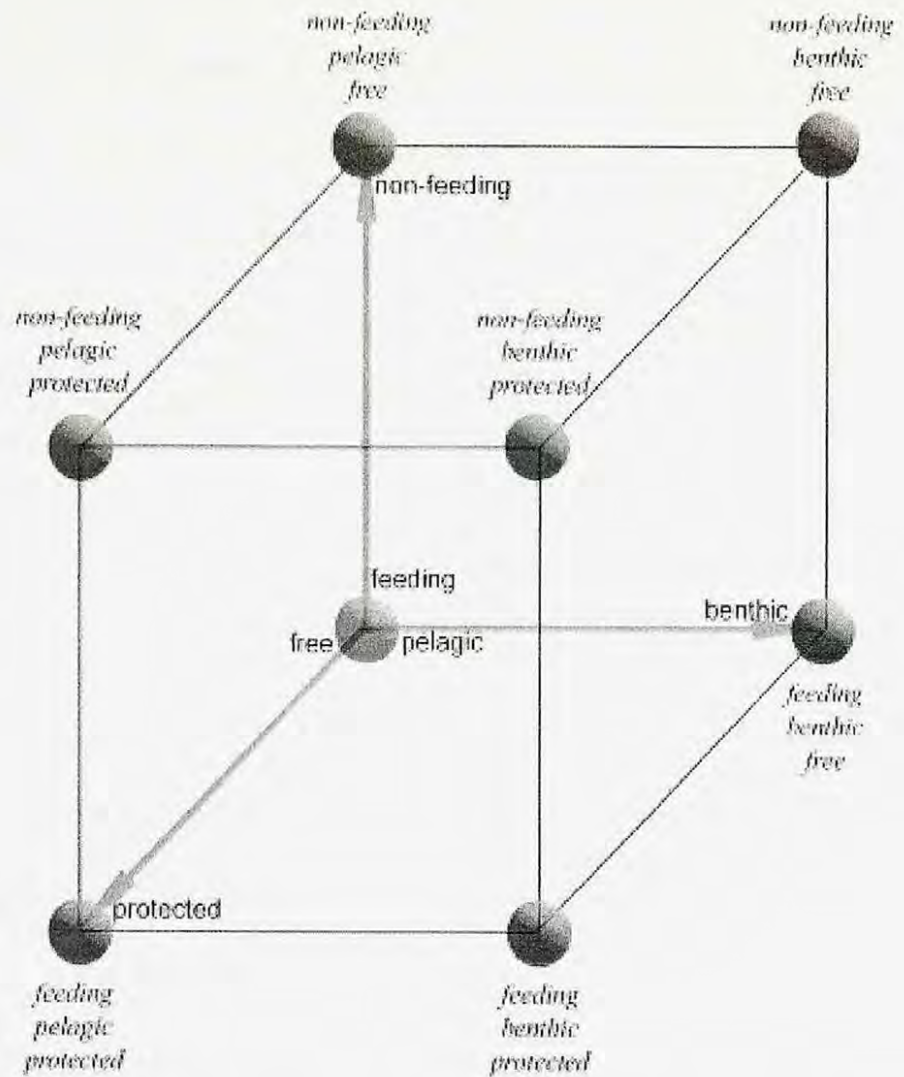


Fig. 1.- Clasificación multifactorial de los distintos patrones de desarrollo en invertebrados marinos. Figura extraída de *Poulin et al.* 2001.

La combinación multifactorial de estas tres categorías independientes, entrega todas las posibles combinaciones de desarrollo en invertebrados

marinos. En particular, la planctotrofia se define como un modo de desarrollo de tipo exotrófico/pelágico/libre, la lecitotrofia como endotrófico/pelágico/libre y la Incubación como endotrófico /béntico/protegido.

Estos patrones de desarrollo y sus correspondientes sistemas de reproducción muestran ciertos compromisos o "trade-off" asociados al cuidado parental, fecundidad, mortalidad, dispersión de la descendencia y tiempo de desarrollo que van a influenciar el éxito reproductivo de la especie (McEdward & Janies 1997, Lawrence and Herrera 2000, Gillespie & McClintock 2007).

En el caso de la incubación, los embriones se nutren del huevo materno (nutrición endo-embriónica), se desarrollan generalmente sobre el fondo marino y durante su incubación permanecen protegidos en cápsulas, en estructuras externas del adulto o directamente en el interior de la madre (Strathmann 1982, Schatt 1996, Pechenik 1999, Poulin 2001). En este caso el "trade-off" implica una baja producción de huevos por parte de la hembra, los cuales requieren una alta inversión tanto en la asignación de recursos para su elaboración como en el cuidado parental, traduciéndose en una alta tasa de sobrevivencia de la descendencia (Fernández *et al.* 2000, Gillespie & McClintock 2007)

Una de las principales consecuencias de la incubación en especies bentónicas asociadas a un tipo de protección, es la ausencia de una fase de

dispersión, cuyas características como la duración de la fase larval y la selección de sitios de asentamiento, son importantes en el establecimiento de los patrones espaciales de las especies (Trush 1991, Carlon & Olson 1993, Riginos & Victor 2001, Taylor & Hellberg 2003). Algunos de los efectos de esta ausencia de dispersión larval tienen relación con la genética poblacional (consecuencia microevolutiva: estructuración) y evolución de las especies (consecuencia macroevolutiva: evolución de un clado en particular) (Gooch 1975, Hedgecock 1986, Poulin & Féral 1995, 1996, Paulay & Meyer 2006, Ledoux *et al.* 2010).

Aun cuando la planctotrofia se establece como el modo de desarrollo más conspicuo, exhibiendo un alto número de taxa con una amplia distribución en los sistemas marinos (Mileikovsky 1971, Rex & Warén 1982, Wray & Raff 1991, Johannesson 1992, Pechenik 1999, Chiantore *et al.* 2005); la incubación está presente en la mayoría de los sistemas marinos (Atlántico Norte: McClary & Mladenov; Australia: Johnston & Lee 2008; Chile: Brante *et al.* 2011, Chaparro & Thompson 1998; Argentina: Gil 2009; Canadá: Sewell 1994; Estados Unidos: Brazeau *et al.* 1998). En particular, la Antártica es la única región del mundo que exhibe una alta proporción de especies incubantes en comparación con otros modos de desarrollo (Dell 1972, Schatt & Féral 1991, Poulin & Féral 1996, David *et al.* 2005, Lockhart *et al.* 1994, Pearse *et al.* 2008). Esta predominancia de la

incubación en numerosos grupos taxonómicos en altas latitudes, ha sido tradicionalmente interpretada como el resultado de una convergencia adaptativa, debido a las condiciones ambientales extremas (Pearse 1994, Poulin & Féral 1996, Pearse & Lockhart 2004, Pearse *et al.* 2008). Los bajos niveles de salinidad (Östergreen 1912, Pearse 1969, Picken 1980), bajas temperaturas (Dunbar 1968, Thatje 2005b) y cortos periodos de productividad primaria (Picken 1980, Thatje *et al.* 2005a, 2005b), han sido los factores descritos como los agentes selectivos que habrían inducido la evolución de modos pelágicos hacia la incubación en la mayoría de los grupos de invertebrados antárticos (Pearse *et al.* 2008).

La extinción selectiva, es otra de las hipótesis propuestas para explicar la predominancia de la incubación en esta zona. Poulin & Féral (1994) plantearon que la alta proporción de desarrollos no-pelágicos en la Antártica, se debería a una extinción masiva de especies con desarrollo pelágico, resultando una desproporción en el número de especies con desarrollo no-pelágico. Estas extinciones pudieron haberse generado por las amplias extensiones de capas de hielo alcanzadas durante los periodos glaciales que caracterizaron el Pleistoceno y el Plioceno en menor medida (Ciesielkin *et al.* 1982, Imbrie *et al.* 1984, Grobe & Mackensen 1992, Schackleton 2000, Zachos *et al.* 2001). Estas extensiones de

hielo cubrieron gran parte del Océano Austral impidiendo el paso de luz, produciendo así una disminución del fitoplancton, principal alimento de la larva planctotrófica (Poulin & Féral 1996, Poulin *et al.* 2002, Thatje 2005b). Por otro lado, Pearse *et al.* (2008) plantea una especiación potenciada (*enhanced speciation*) en aquellos taxa que presentan un desarrollo lecitotrófico influenciado por ciclos glaciales ocurridos durante el Plioceno/Pleistoceno (Hipótesis de la Plataforma Continental Antártica) o por movimiento de estas especies a través del paso Drake por la Corriente Circumpolar Antártica (Hipótesis CCA).

A pesar de las numerosas contribuciones que se han realizado para explicar los mecanismos asociados a la alta predominancia de la incubación en la Antártica, estas corresponden a un desarrollo teórico – que si bien es cierto, ayudan a entender los escenarios evolutivos a una macro escala – no entregan evidencia empírica con respecto a las consecuencias de la incubación. La ausencia de estudios en genética de poblaciones, estructuración y sistemas de reproducción, generan un abandono del conocimiento micro evolutivo asociados a los efectos de este modo de desarrollo en particular. Por lo que se hace fundamental avanzar en el estudio de estos efectos y así contestar estas interrogantes en especies incubantes del Océano Austral.

En el Océano Austral, la mayor diversidad de erizos está concentrada en la familia Schizasteridae. Está representada por 30 especies agrupados en ocho géneros, de los cuales, seis de ellos son incubantes: *Parapneustes*, *Amphipneustes*, *Brachysternaster*, *Delapatagus*, *Genicopatagus* *Tripylus* y *Abatus* (David *et al.* 2005). La mayor parte de las especies son depositívoros y viven levemente enterrados en el sedimento (Schatt & Féral 1991, Schinner & McClintock 1993, Poulin & Féral 1995, Chenuil *et al.* 2004). Su distribución comprende desde la zona intermareal a zonas más profundas de hasta 5700m (David *et al.* 2005).

Actualmente, el género *Abatus* incluye once especies de erizos irregulares, depositívoros, cuya distribución es principalmente en regiones antárticas y subantárticas (David *et al.* 2005). Su distribución batimétrica es desde la costa hasta los 3000 m de profundidad, aunque la mayor densidad se encuentra entre los 5 y 300m (Fig. 2).

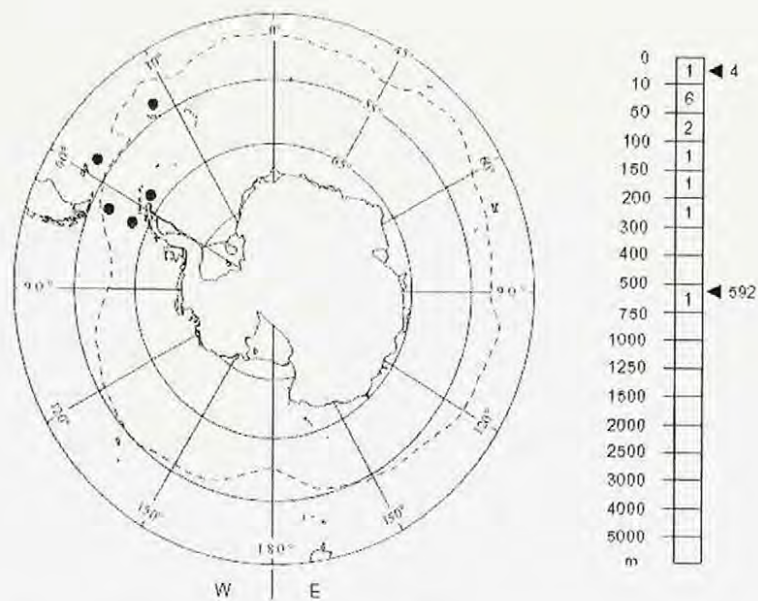


Fig. 2.- Distribución geográfica y batimétrica de *Abatus agassizii* (Mortensen 1910). La escala batimétrica (derecha) indica el rango de profundidad total de la especie (flechas y números a lo largo de la escala) Los número dentro de la escala indican la ocurrencia de la especie en el rango. (Imagen obtenida de ANTARCTIC ECHINOIDE, David et al. 2005)

Todas las especies presentan incubación y aunque el desarrollo directo ha sido revisado solo en *A. cordatus*, endémico del Archipiélago Kerguelen (Schatt & Féral 1991), es probable que todo el género presente este tipo de desarrollo. Este tipo de desarrollo, se caracteriza por ocurrir en el interior de la madre, sin pasar en ningún momento por estructuras larvales. Los individuos al alcanzar el último estadio del desarrollo, son liberados hacia el exterior (Magniez 1983, Schatt & Féral 1991, McEdward & Janies 1993, Schatt & Féral 1996).

Numerosas han sido las contribuciones en este género, con respecto al estudio de los sistemas de reproducción-desarrollo y sus implicancias, principalmente en especies Subantárticas, como *A. cordatus* y *A. cavernosus* (Magniez 1983, Schatt & Féral 1991, Poulin & Féral 1995, Schatt & Féral 1996, Tesis doctorales Jean-Baptiste Ledoux, Elie Poulin). Estos estudios han encontrado una amplia variación en algunos parámetros reproductivos, como patrones de desarrollo gonadal y ciclos de incubación, liberación de gametos, periodos reproductivos, distribución de los huevos en los bolsillos incubantes y su tamaño (Magniez 1983, Pearse & McClintock 1990, Schatt & Féral 1991). Sin embargo, existe una disparidad con el bajo número de investigaciones en especies Antárticas *A. nimrodi*, *A. shackletoni* y *A. agassizii* (Pearse & McClintock 1990, Chenuil *et al.* 2004, Chiantore *et al.* 2006). Interesantemente, estos estudios demostraron ser muy contrastantes con respecto a los patrones de reproducción observados en especies subantárticas, lo que demuestra una clara necesidad de seguir trabajando en estas regiones y en las diferencias encontradas.

Este trabajo pretende - además de seguir aportando a las evaluaciones de estos contrastes en los sistemas de reproducción del género *Abatus* - incorporar nueva información en una especie Antártica respecto a la estacionalidad de los ciclos reproductivos y modalidad de apareamiento como consecuencia de la

estrategia de incubación. La detección de multipaternidad a partir de un apareamiento múltiple representaría la primera investigación que involucra análisis de paternidad en estas regiones.

CAPITULO I

ESTACIONALIDAD Y CALENDARIZACION DE LOS CICLOS REPRODUCTIVOS EN

A. agassizii

INTRODUCCIÓN

A nivel del individuo, Giese (1974) define los ciclos reproductivos como una serie de eventos desde el momento de la activación, crecimiento y gametogénesis en la gónada hasta la liberación de gametos y posterior descanso de la actividad gonadal, en el cual los tejidos se regeneran marcando el término del ciclo. El ciclo vuelve a comenzar cuando existe una reactivación del tejido de la gónada. Por lo tanto cada ciclo reproductivo puede ser dividido en periodos reproductivos y de descanso.

Los periodos reproductivos pueden ser caracterizados por varios ciclos gametogénicos - proliferación y gametogénesis (G) - seguidos por eventos de liberación (S) y breves descansos (R), los cuales determinan el final de cada periodo reproductivo. Esto implica que existiría más de un evento reproductivo

en un ciclo, ya que puede haber varios ciclos gametogénicos durante un periodo reproductivo (Giese 1974). En otras palabras, se pueden producir más de una camada en un ciclo reproductivo, porque hay más de un ciclo de producción de gametos (Fig. I-1).



Fig. I-1.- Diagrama esquemático de un ciclo reproductivo a nivel de individuo.

Al nivel de la población, se puede identificar un ciclo reproductivo cuando la mayoría de los individuos entra de manera simultánea en su periodo reproductivo y tiene gametos maduros disponibles para liberar (Giese & Pearse 1974). En el caso contrario, una población puede tener una

reproducción continua durante el año, encontrándose todas las fases de un ciclo gametogénico entre diferentes individuos (Pearse & Cameron 1991). Esta situación se puede producir cuando los mismos individuos presentan una reproducción continua o cuando presentan ciclos reproductivos discretos, pero desfasados. Este mismo esquema se puede aplicar a nivel de especie, donde se puede identificar un ciclo reproductivo cuando las diferentes poblaciones entran de manera simultánea en su periodo reproductivo a lo largo del rango de distribución (Tabla I-1)

Tabla I-1.- Resumen de los distintos tipos de ciclo reproductivo que se pueden identificar en tres distintos niveles.

Especie	Población	Individuo
Reproducción Continua (sin ciclo)	Continua	Continua
		Discreta/Desfasada
	Discreta/Desfasada	Discreta
Reproducción Discreta (con ciclo)	Discreta	Discreta

La existencia de los ciclos reproductivos al nivel de una población, puede ser explicada por los factores que los determinan (Baker 1938). Los factores

proximales (*proximate factors*) son aquellos necesarios para mantener las características propias de un ciclo reproductivo en una población, como la temporalidad; mientras que los factores últimos (*ultimate factors*) serían aquellos que otorgan valor adaptativo a un determinado ciclo reproductivo. Es decir, cuando una población libera sus gametos en determinadas condiciones y en un tiempo específico, se identifica un mecanismo (*proximate factor*) y un valor adaptativo (*ultimate factors*) asociado. Clark (1979) redefine estos conceptos y agrega las *condiciones necesarias* para gatillar un evento específico del ciclo reproductivo (*i.e* mecanismos celulares involucrados en maduración de gametos, conductas de agregación y sincronización) y las *señales ambientales específicas* (*i.e* temperatura, productividad primaria, fotoperiodo) que influyen los tiempos de los distintos eventos de un ciclo reproductivo (Olive 1995, Mercier & Hamel 2009).

Los factores que responden a mecanismos regulatorios involucrados en la activación celular o sistémica de los distintos eventos de un ciclo reproductivo de un individuo, están ligados a las señales del ambiente. Estas señales del entorno tienen un comportamiento cíclico, el cual puede ser graficado por ejemplo, con el fotoperiodo, el cual influye la temperatura superficial del agua, como también modula los procesos de fotosíntesis del fitoplancton,

aumentando o disminuyendo su producción, factores determinantes en los sistemas de reproducción (Orton 1920, Clarke 1988, Mercier & Hamel 2009). La periodicidad de las variables ambientales es la causa que la reproducción en muchos taxa sea cíclica (Giese 1959, Richard 1971, McQueen & Steel 1980, Simmond 1972, Pearse *et al.* 1986, Verheul *et al.* 2006, Muthiga & Kawaka 2008). En una población, los individuos pueden mostrar una liberación simultánea de sus gametos frente a un pulso de productividad primaria (Lightfoot *et al.* 1979, Picken 1980, Tyler *et al.* 1982b, Grange *et al.* 2004, Sumida *et al.* 2000, Galley *et al.* 2008). En otras palabras, una alta disponibilidad de alimento (señal específica) provoca una activación de mecanismos celulares y conductuales para la liberación de gametos produciendo una sincronización intrapoblacional en este evento específico. Una liberación en masa juveniles/larvas durante un pulso de productividad aumenta las probabilidades de sobrevivencia de la descendencia (*ultimate factor*) (Minge 1975, Boivin *et al.* 1986, Martel *et al.* 1986, Pearse & Cameron 1991, Hamel & Mercier 1995, Muthiga & Jaccarini 2005, Bowden 2009).

En una misma especie, se ha observado en muchas oportunidades que distintas poblaciones geográficas muestran diferencias en la duración y periodicidad en sus ciclos reproductivos (Sewell 1992, Hamel & Mercier 1996, Oyarzun *et al.* 2010). Estas diferencias han sido generalmente atribuidas a

variaciones en las condiciones ambientales locales, tales como la temperatura del agua, salinidad, fotoperiodo y la disponibilidad de alimento, entre otros (Webber & Giese 1969, Giese & Pearse 1974, Bayne & Newell 1983, Kang *et al.* 2000). Debido a que estas variables ambientales se encuentran generalmente asociadas a la latitud y la profundidad, los ciclos reproductivos varían generalmente según un patrón de gradientes latitudinales y batimétricos (Pearse & Cameron 1991, Conand 1993, Stanwell-Smith *et al.* 1997, Mercier & Hamel 2009). En holotúridos se ha observado diferencias en tejidos y estructuras gonadales que reflejan diferencias en ciclos gametogénicos. En este ejemplo, un solo tipo de estructura gonadal originaría un solo ciclo gametogénico durante el año; mientras que una estructura tisular más compleja (variaciones en tamaño y madurez) promovería varios ciclos gametogénicos durante el año. Estas diferencias estructurales podrían deberse a diferencias geográficas, como lo demostró Sewell (1992) con *Stichopus mollis* del noreste de Nueva Zelanda y que fue corroborado por Hamel y Mercier (1996) con *Cucumaria frondosa* utilizando poblaciones a diferentes latitudes. Los resultados de estos estudios señalan la incidencia de una plasticidad en la morfología gonadal de las poblaciones de holotúridos sometidos a diferentes condiciones ambientales. Esto también se vería reflejado en los ciclos gametogénicos en individuos de *Perumytilus*

purpuratus a diferentes latitudes (Taltal 25° 24'S, 70°28'W y Huasco 28°27'S, 71°13'W), mostrando variaciones en un gradiente latitudinal con respecto al periodo y a la sincronía de reproducción (Oyarzún *et al.* 2010). Asimismo, existen variaciones de los ciclos reproductivos de una misma especie en un gradiente batimétrico. Pierscieniak y colaboradores (2010), observaron que la población somera de la especie *Mytilus trossulus*, presenta liberación de gametos más temprana que aquella que se reproduce en aguas más profundas.

Al nivel biogeográfico, esta asociación entre duración y periodicidad de los ciclos reproductivos con los gradientes latitudinales y batimétricos ha sido elevada al rango de regla general. Orton (1920) define la temperatura como el factor de mayor importancia en modular los ciclos reproductivos en invertebrados marinos. Este planteamiento lo llevó a postular que las especies que habitan áreas con temperaturas constantes o con rangos de variación estrechos, se reproducirían continuamente (*i.e* regiones polares y profundas). La acumulación de evidencias durante décadas apoyando esta hipótesis impulsó a Thorson (1946) a establecer la "Regla de Orton". En este contexto, se predice que las especies de regiones profundas (*deep sea*) muestren una ausencia de ciclos y periodicidad reproductiva (Rokop 1974), debido a que son regiones generalmente consideradas estables en términos físico-químicos, en especial en

su temperatura. Sin embargo, el aumento de evidencia de estacionalidad y periodicidad reproductiva encontrada en estas regiones (Schoener 1968, Lightfoot *et al.* 1979, Tyler *et al.* 1982a, b, Young 2003) fue debilitando esta regla general, indicando que otros factores son probablemente de mayor importancia a la hora de modular la estacionalidad de los ciclos reproductivos. En adición a esto, se señaló que las especies profundas de equinodermos que presentaban ciclo reproductivo producían larvas planctotróficas, mientras que las que no presentan ciclo producían larvas lecitotróficas (Tyler & Gage 1980, Rex & Warén 1982, Tyler *et al.* 1982, Tyler & Young 1992, Sumida *et al.* 2000, Wigham *et al.* 2003, Galley *et al.* 2008). Estas nuevas evidencias sugieren que la estrategia reproductiva de especies profundas con desarrollo planctotrófico estaría sujeta a la producción estacional de fitoplancton; mientras que la reproducción de aquellas especies con desarrollo lecitotrófico tendría una independencia de estos pulsos de productividad reproduciéndose durante continuamente durante el año.

Si bien el Océano Austral se ha descrito como uno de los ambientes más estacionales del mundo (Clarke 1988, Pearse & Cameron 1991, Tyler *et al.* 2003), caracterizado por un corto y marcado patrón de estacionalidad en la productividad primaria (Picken 1980, Rivkin 1990, Pearse *et al.* 1991, Clarke

2002, Grange 2004), en algunas regiones presenta largos periodos de cobertura de hielos (*Permanent Ice Zone*), produciendo ausencia de variaciones en la temperatura superficial del agua, salinidad y fotoperiodo (Galley *et al.* 2005, Tréguer & Jacques 1992). Estas características han sido señaladas como similares a las encontradas en regiones profundas, por lo que uno podría encontrar las mismas estrategias reproductivas y de desarrollo en ambas regiones. Asimismo, estudios de abundancia en meroplanton (Stanwell-Smith 1997, Bowden 2009) y de reclutamiento (Bowden 2005), han mostrado que las larvas planctotróficas exhiben una clara señal estacional, con un periodo reproductivo anual, observándose una mayor abundancia durante el verano austral. En contraste, especies con desarrollo lecitotrófico no serían dependientes de la productividad primaria, por lo que no mostrarían ciclos estacionales en su reproducción (White 1977, Picken 1980, Pearse *et al.* 1991). Esta idea se ve reflejada en algunas especies de peracáridos (*Glyptonotus antarcticus*: Dearborn 1967) y en equinodermos, como estrellas de mar (*Porania sp.*: Bosch 1989, *Diplasterias brucei*: Dearborn 1965, Bosh & Pearse 1990) y algunos erizos incubantes (*Abatus nimrodi* y *A. shackletoni*: Pearse & McClintock 1990), todas estas especies presentes en Bahía McMurdo (77°50'39"S, 166°40'22"E) muestran un desarrollo lecitotrófico y reproducción continua. En el género incubante *Abatus*, las especies antárticas *A.*

shackletoni y *A. nimrodi* no evidencian presencia de ciclo reproductivo, sino una liberación contante de sus gametos y juveniles. Presentarían entonces una actividad reproductiva durante todo el año, posiblemente porque los factores exógenos como temperatura y material orgánico en el sedimento son relativamente estables a lo largo del año (Pearse *et al.* 1986, Pearse & McClintock 1990). En contraste, *A. cordatus*, endémico de las Islas Kerguelen 49° 21'S, 70° 12'E (Región Subantártica) presenta un ciclo reproductivo anual, en el cual las crías incubadas son liberadas muy cerca de la madre durante verano, posiblemente para aprovechar el aumento de la productividad primaria (Magniez 1983, Schatt 1985, Pearse *et al.* 1986, Schatt & Féral 1991, Poulin & Féral 1995). Así mismo, un estudio realizado en Puerto Deseado 47°45' S, 65°52' W (Patagonia Argentina) muestra que *A. cavernosus* exhibe un ciclo reproductivo anual y que las madres liberan durante el verano austral a sus crías incubadas (Gil 2009).

Abatus agassizii, presenta una distribución Antártica y Subantártica. En particular, la población de estudio se encuentra en la bahía Fildes (62° 12'S 58° 58' W) de la Isla Rey Jorge, Islas Shetland del Sur. Esta zona, a pesar de estar dentro del círculo antártico, es una región cuyas condiciones ambientales son bastante similares a las regiones subantárticas, es decir, una marcada variación

de temperatura durante el año (Branch *et al.* 1993, Gil 2009), cambios en el fotoperiodo, importantes fluctuaciones en la productividad primaria (Hernando 2006, Pérez *et al.* 2010) y una baja perturbación por hielo (Palma 2007). Además es una de las zonas más afectadas por el calentamiento global (Hughes 2000, Schofield 2010). Este peculiar escenario permite evaluar la estacionalidad de los ciclos reproductivos y compararla con los descritos en especies hermanas en regiones antárticas y subantárticas.

Este trabajo, además de incorporar información de una especie de la cual no se conoce nada acerca de su sistema de reproducción, contribuye a entender como los factores ambientales de una región influyen en el establecimiento de los patrones reproductivos de una especie. Como información adicional, estudiaremos el ciclo reproductivo de *Tripylus abatoide*. Una especie que – al igual que *A. agassizii* – presenta simetría irregular, incubación y pertenece a la familia Schizasteridae, además vive en simpatria-sintopía y sus caracteres morfológicos son muy similares. Debido a que no se conoce la biología reproductiva de *T. abatoides*, resulta interesante evaluar la existencia de un ciclo reproductivo y determinar si muestra diferencias temporales o de periodicidad con *A. agassizii*. La ausencia de estas diferencias (*i.e* sincronización) en sus ciclos reproductivos, podría deberse a una respuesta simultánea frente los factores

ambientales locales. Mientras que un posible desfase de los ciclos, podría indicarnos una estrategia evolutiva de aislamiento reproductivo de ambas especies. Ambas causas tendrían importantes inferencias tanto ecológicas como evolutivas en los sistemas de reproducción y especiación.

De los antecedentes previamente expuestos, se desprenden las siguientes hipótesis.

1) Estacionalidad reproductiva

La existencia de una estacionalidad reproductiva marcada en las especies subantárticas del género *Abatus*, no se ha observado en especies antárticas del mismo género, por lo que *Abatus agassizii*, proveniente de la Península Antártica, no mostraría esta estacionalidad.

Por lo tanto se predice que: se observarán todos los estadios del desarrollo sin diferencias significativas en sus proporciones

2) Diferencias interespecíficas *Tripylus abatoides* & *Abatus agassizii*

Debido a que *T. agassizii* y *A. agassizii* viven en simpatria y sintopía, se ven influenciada por los mismos factores ambientales, por lo que *T. agassizii* no mostraría diferencias significativas con *A. agassizii* con respecto su estacionalidad reproductiva.

Por lo tanto se predice que: en *T. agassizii* se observara la misma tendencia observada en *A. agassizii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Área de estudio

El sitio de estudio se encuentra en la Península Ardley en Bahía Fildes ($62^{\circ} 12' 30,31$ S, $58^{\circ} 55' 34,79$ W), ubicada en la parte suroeste de la Isla Rey Jorge en las Islas Shetland del Sur (Fig. I-2a, 2b). La Bahía Fildes tiene un sistema semicerrado con una abertura hacia el sur (Palma *et al.* 2007), presenta una ausencia de perturbaciones por hielo durante el verano – época en que se realizaron todos los muestreos.

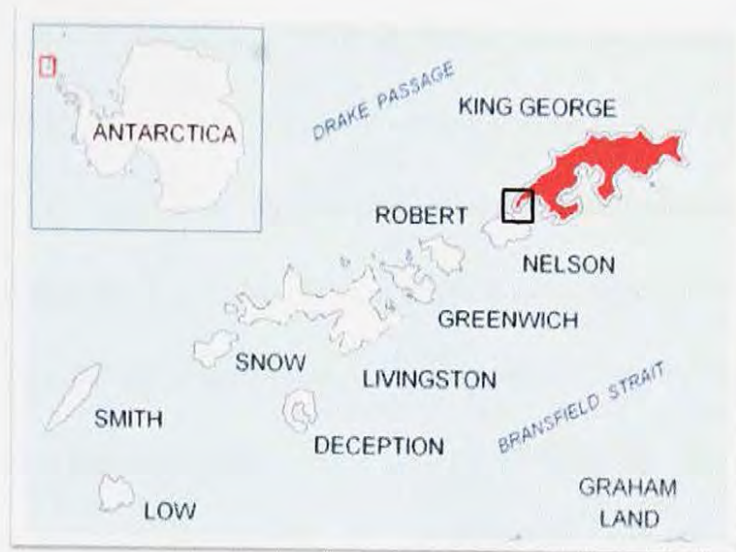


Fig.I-2a.- Mapa de Islas Shetland en el continente antártico. Región en rojo señala Isla Rey Jorge, lugar donde se ubica Bahía Fildes (recuadro negro)

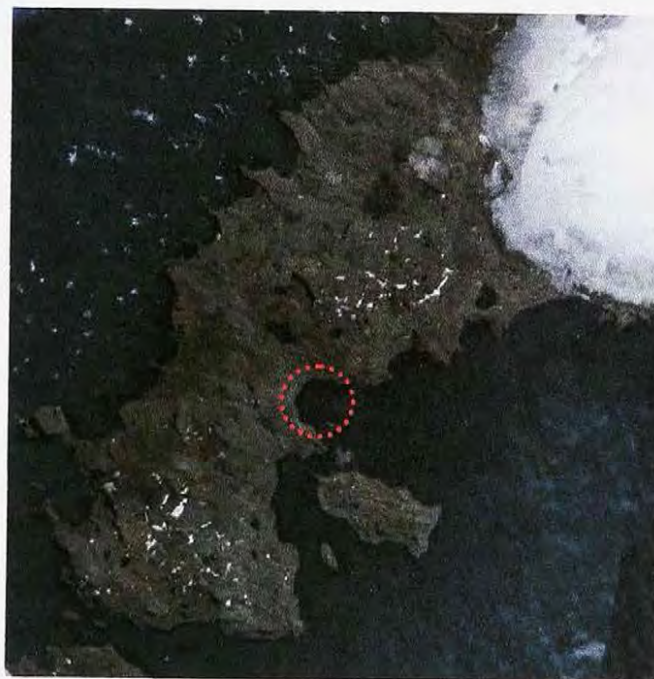


Fig. I-2b.- Fotografía Satelital de Península Fildes en Isla Rey Jorge, Islas Shetland. En círculo en rojo representa la Bahía Fildes. (Fotografía gentileza de Dirck Schories)

2) Características de la población de *A. agassizii*

A. agassizii (Mortensen 1910) ha sido encontrada principalmente en las Islas Shetland y Georgias del Sur, sin embargo también se ha reportado al este del Mar de Weddell, Islas Falkland y al extremo sur de Tierra del Fuego, Canal de Beagle (David *et al.* 2005). En las zonas más someras de Bahía Fildes, *A. agassizii* es una de las especies más abundantes con un claro patrón de agregación (Palma *et al.* 2007). En los sitios estudiados, esta especie depositívora se encuentra en sustratos blandos, desde lodosos hasta arenosos, principalmente entre los 3 y 5m de profundidad. La distribución de tamaño de testa se encuentra entre 4 y 45mm de diámetro, exhibiendo una distribución normal con tamaño intermedios como los más abundantes (Palma *et al.* 2007). Además *A. agassizii* habita en simpatría y sintopía (*i.e* viven juntos en la misma localidad) con *T. abatooides*, otro Schizasteridae incubante cuyas características morfológicas son bastante similares (Fig. I-3.), siendo la separación del fasciolo en *Tripylus* el carácter diagnóstico más relevante.



Fig. I-3.- Morfología de dos Schizasteridae incubantes en Bahía Fildes.

Der: *A. agassizii*, Izq: *T. abatoides*.

3) Recolección de muestras en terreno.-

Los muestreos en terreno durante los años 2008, 2009, 2010 y 2011, fueron realizados bajo el marco de Proyecto ECCOS – Conicyt/2008, FONDECYT F_01-09, INACH D_05-09 e INACH M_02-10. Todos ellos fueron recolecciones al azar mediante buceo, realizados exclusivamente durante los meses de Enero y Febrero (fechas de las campañas científicas antárticas).

A excepción del muestreo del 2011, las muestras fueron fijadas con alcohol 95% en frascos debidamente sellados y rotulados. Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Ecología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para su reconocimiento y

caracterización. Para el caso del muestreo realizado durante la campaña 2011, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de la Base Científica Chilena “Prof. Julio Escudero”, en la Isla Rey Jorge. Durante este año, se colectó también una muestra de *A. agassizii* en un segundo sitio, ubicado a 4 km hacia el sur de la Península Fildes (62° 13' 7,64 S; 58° 57' 28,30 W), descubierto durante esta expedición (ECA 47) (Fig. I-4). Durante este buceo, se logró coleccionar 10 individuos de la especie *T. abatoides* con el fin de comparar los ciclos reproductivo entre ambas especies.

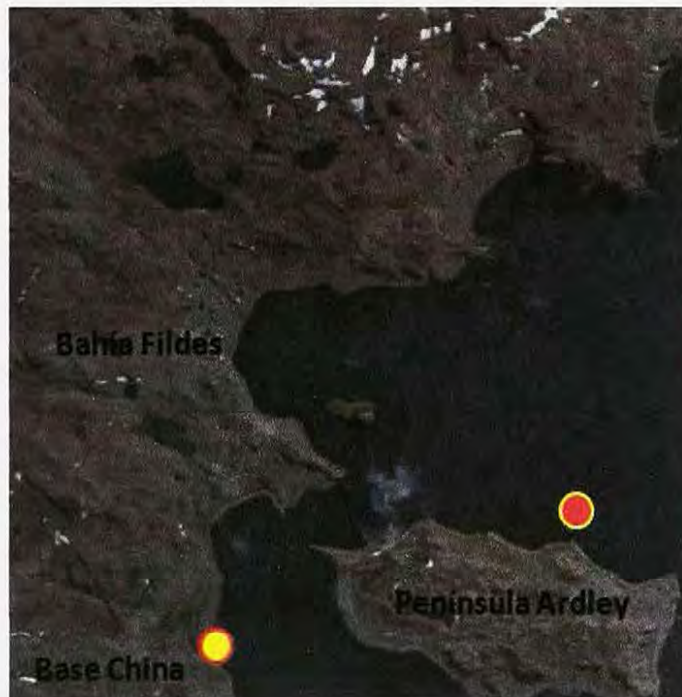


Fig. I-4.- Fotografía aérea de Bahía Fildes e Isla Ardley. Isla Rey Jorge, Antártica. Los círculos señalan los sitio de estudio de *Abatus agazzisii*, en rojo: Península Ardley (PAr); en amarillo: Playa de Base China (BCh). (Fotografía gentileza de Dirck Shories)

Adicionalmente a estos muestreos, algunos datos de tamaño, sexaje y estadios de desarrollo fueron rescatados de la expedición realizada en el año 2004 en el marco del proyecto INACH 02-02.

4) Tamaño de madurez sexual en *A. agassizii*

El tamaño corporal fue medido por el largo de testa antero-posterior de cada individuo utilizando un pie de metro (Fig. I-5). Para definir un criterio de discriminación entre individuos adultos y juveniles, se estimó el tamaño de primera reproducción o madurez sexual. Esto se realizó considerando a la hembra incubante de menor tamaño muestreada entre todos los años de estudio ($N_{\text{incubantes}} = 93$). Individuos bajo este largo de testa (TL) fueron considerados inmaduros (i) y aquellos por sobre este largo de testa, fueron clasificados como machos o hembras en base a los criterios descritos más adelante.



Fig. I-5.- Medición de individuos de *A. agassizii* utilizando un pie de metro en laboratorio de Base Científica Chilena "Prof. Julio Escudero" en la Isla Rey Jorge.

5) Razón de sexo, distribución de talla e incubación

Los individuos adultos de *A. agassizii* fueron identificados según sexo, basándose en la presencia de cuatro bolsillos dorsales (marsupios) desarrollados sólo en hembras, carácter de dimorfismo sexual asociado a la incubación (Schatt 1996).

Se realizó un test de permutaciones en Rndom Project v1.1 (Jadwiszczak 2003), utilizando 10000 iteraciones, para evaluar la posible diferencia de tamaño promedio entre ambos sexos y se graficó la distribución de frecuencia de los

tamaños de testa de todos los individuos, contrastando la proporción de machos y hembras para TL superiores al tamaño de primera reproducción.

Se realizó un test exacto de Fisher para evaluar una posible desviación a la proporción de sexo de 1:1.

En las hembras, se registró la presencia/ausencia de crías en el interior de sus bolsillos incubantes, las cuales fueron separadas para su posterior estudio.

La relación entre la proporción total de crías (TC) y el tamaño de testa (TL) de todas las madres muestreadas durante los cuatro años (2008-2011) fue testeada utilizando una regresión lineal simple con un intervalo de confianza de 0.95.

6) Identificación, abundancia y distribución de los estadios de desarrollo

Tanto los embriones como juveniles, fueron removidos cuidadosamente de los cuatro bolsillos dorsales incubantes de cada madre. Las crías fueron registradas según el estadio de desarrollo que presentaban al momento de la observación. Las determinaciones del estadio de desarrollo se realizaron por simple inspección bajo lupa, siguiendo como referencia la clasificación de Schatt & Féral (1996).

Para cada hembra incubante, se registró la cantidad y proporción de cada estadio. A partir de estos valores, se calcularon (1) el número promedio de cada estadio por hembra para los años 2008, 2009, 2010 y 2011 y (2) la frecuencia promedio de cada estadio por madre para los mismos años.

Los bolsillos fueron identificados según los pétalos ambulacrales de acuerdo al sistema Lovén (1874) (Fig. I-6). Todas las crías fueron extraídas y registradas en relación al marsupio donde se encontraban. Para ver si existe una diferencia en el número de crías entre bolsillos, se realizó un test de permutación (n=10000) en Rndom Project v1.1 (Jadwiszczak 2003).

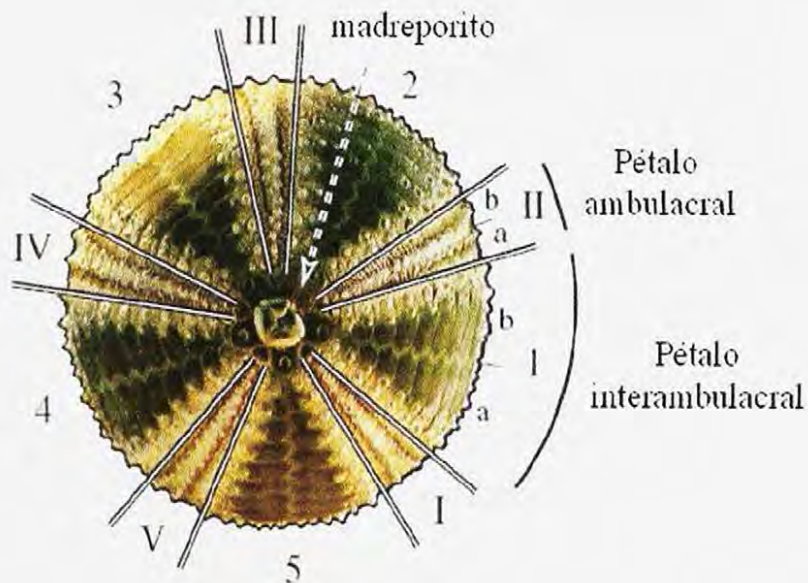


Fig. I-6.- Sistema de Lovén (1874) en la denominación de placas en un erizo regular. (Fotografía extraída del libro ANTARCTIC ECHINOIDEA David *et al.* 2005 Pág. 33)

7) Determinación de ciclos reproductivos en *A. agassizii*

Debido a que no contábamos con muestreos permanentes durante todo el año que nos permitiera visualizar el estado de maduración de la gónada, la determinación de la estacionalidad reproductiva de *A. agassizii* fue basado en el ciclo de desarrollo y reproductivo de la especie hermana *A. cordatus* (Shatt & Féral 1996, Magniez 1983). Esta especie ha sido la única de este género que tiene estudios embriológicos descriptivos, la cual estima los tiempos de desarrollo de cada estadio (Fig. I-7). Según estas estimaciones, los estadios E1, E2, E3 y E4 tendrían una duración de 65, 65, 67 y 57 días respectivamente. Tomando en cuenta posibles diferencias entre especies, poblaciones e individuos, consideraremos para nuestro estudio, una duración equivalente para cada uno de los estadios (*i.e* 65 días).

Bajo la hipótesis de una reproducción continua (*i.e* sin ciclo reproductivo) observaríamos una proporción de 0,25 para cada uno de los estadios de desarrollo. Es decir, en presencia de ciclo observaríamos una desviación significativa entre las proporciones observadas de los distintos estadios en cada madre y lo esperado bajo un modelo nulo de reproducción continua.

Se realizaron pruebas de χ^2 en hembras incubantes utilizando las proporciones de cada uno de los estadios observadas y aquellas que esperaríamos bajo un sistema de reproducción continua. Sólo fueron evaluadas aquellas madres que presentaban más de 20 crías incubadas ($N_{2008}= 19$; $N_{2009}=16$; $N_{2010}= 14$; $N_{2011}= 18$)

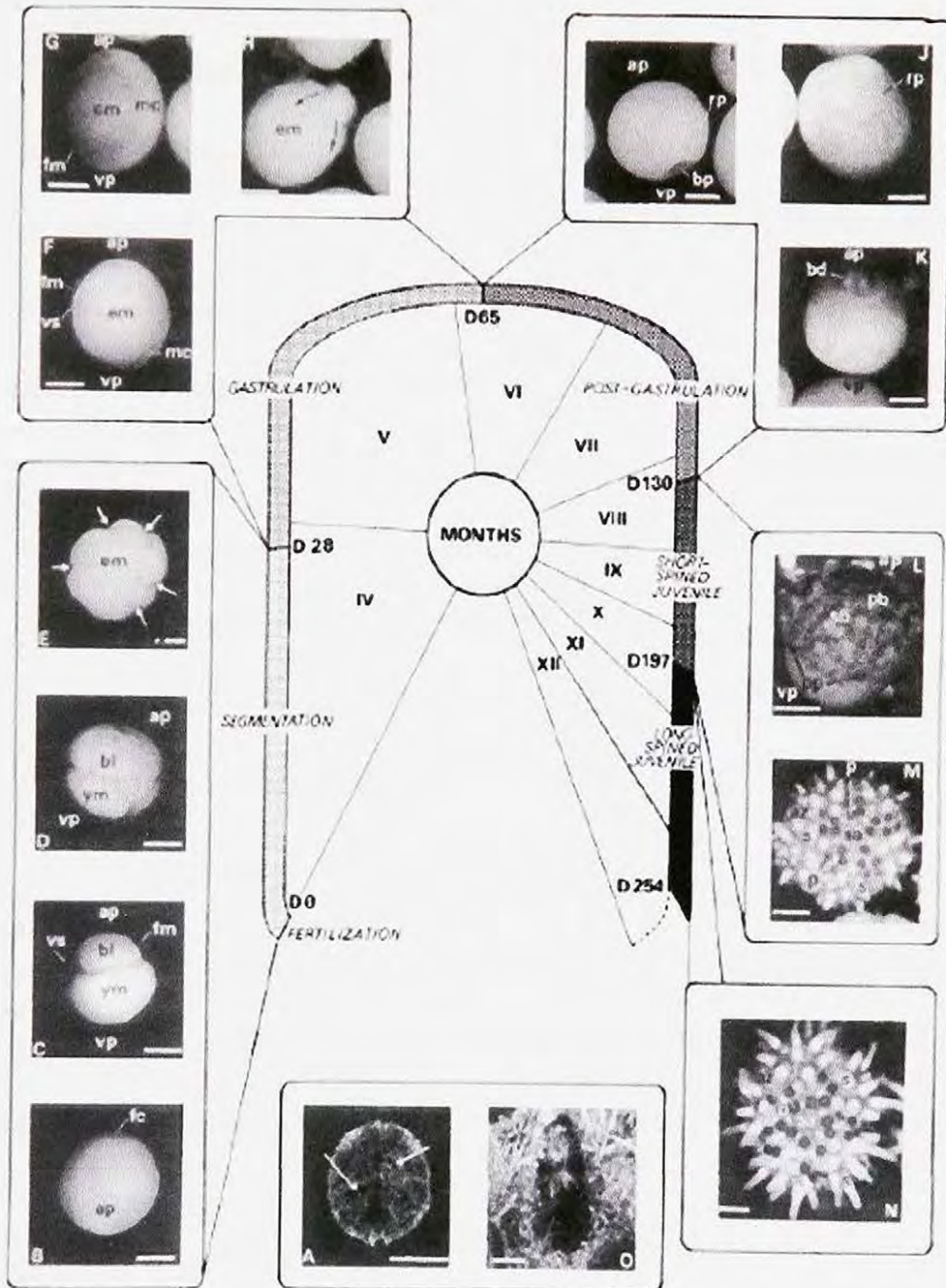


Fig. I-7.- Esquema del ciclo de desarrollo de *A. cordatus*. (Fotografía tomada del artículo de Schatt & Féral, 1996).

8) Evidencia de sincronía

Para comprobar si las madres de la población se encontraban en fase con su ciclo reproductivo, se estudiaron a nivel poblacional las posibles diferencias en proporción de los estadios del desarrollo de las crías incubadas. En presencia de sincronía, se observarían variaciones significativas de la proporción de los diferentes estadios entre las madres. Para esto, se realizó un ANOVA de una vía en STADISTICA 7.0, utilizando las proporciones de los distintos estadios por madre. Estos análisis fueron realizados por año. Se utilizaron las mismas madres estudiadas para la determinación de ciclo.

9) Diferencias interanuales

Se evaluó la existencia de un ciclo reproductivo en cada uno de los años estudiados y detectó posibles diferencias interanuales. Para determinar si existen diferencias entre cada uno de los años analizados e identificar cuales generan las mayores diferencias, se realizó un ANOVA multifactorial y test de Tukey desigual N HSD, respectivamente.

10) Comparación de estacionalidad reproductiva entre dos sitios de estudio

Se evaluó posibles diferencias de ciclo reproductivo de *A. agassizii* entre dos sitios de estudio, separados por aproximadamente 1.9Km. En el sitio de Base China (BCh) se escogieron 10 madres al azar y se realizó la misma metodología utilizada en el primer sitio de muestreo en Península Ardley (PAr), con respecto a la medición de tamaño, identificación y conteo de los distintos estadios de desarrollo en las crías recolectadas en los bolsillos incubantes.

Se determinó la existencia de ciclo reproductivo, realizando pruebas de χ^2 en hembras de más de 20 crías (N = 5), bajo el mismo modelo nulo de reproducción continua utilizado en sitio PAr. Es decir, en presencia de ciclo reproductivo observaríamos una desviación significativa entre las proporciones observadas de los distintos estadios en cada madre y lo esperado bajo un modelo nulo de reproducción continua.

Para determinar si existen diferencias entre sitios y entre estadios analizados e identificar cuales generan las mayores diferencias, se realizó un ANOVA multifactorial y test de Tukey desigual N HSD, respectivamente en

STATISTICA

7.0.

11) Comparación de estacionalidad reproductiva entre dos especies incubantes

Se evaluaron posibles diferencias de ciclo reproductivo entre dos especies incubantes pertenecientes a la misma familia Schizasteridae en el mismo sitio de estudio (Base China) durante el muestreo del año 2011. Se escogieron 10 madres de *T. abatoides* al azar y se realizó la misma metodología de medición de testa, identificación y conteo de los distintos estadios de desarrollo de las crías recolectadas en los bolsillos incubantes maternos. Para la identificación de estadios, también se utilizó la descripción del desarrollo del schizasteridae *A. cordatus* de Schatt y Féral (1996).

Se determinó la existencia de ciclo reproductivo, realizando pruebas de χ^2 en hembras de más de 20 crías ($N = 6$), bajo el mismo modelo nulo de reproducción continua utilizado en *A. agassizii*. Es decir, en presencia de ciclo reproductivo observaríamos una desviación significativa entre las proporciones observadas de los distintos estadios en cada madre y lo esperado bajo un modelo nulo de reproducción continua.

Para determinar si existen diferencias entre especies y entre estadios e identificar cuales generan las mayores diferencias, se realizó un ANOVA

multifactorial y test de Tukey desigual N HSD, respectivamente en STATISTICA 7.0.

12) Calendarización de ciclos reproductivos

A partir del modelo de desarrollo propuesto por Schatt y Féral (1996) para *A. cordatus*, se construyó un esquema para graficar los eventos reproductivos en su especie hermana, *A. agassizii*. El establecimiento de eventos reproductivos se realizó por año y en ambos sitios de estudio (BCh y PAr).

Para las estimaciones de las fechas de los eventos reproductivos, se calculó el centro de gravedad en función de las abundancias relativas de cada estadio (E_i y E_j) por madre, quedando expresando de la siguiente forma:

$$\frac{(\text{Pr } E_i \times \text{Día } E_i) + (\text{Pr } E_j \times \text{Día } E_j)}{(\text{Pr } E_i + \text{Pr } E_j)}$$

Esto fue realizado para los dos ciclos por

separado (E_1+E_2 y E_3+E_4). De esta misma forma se calendarizaron los eventos reproductivos en *T. abatoides*.

RESULTADOS

I. Caracterización de la población de *A. agassizii* en Bahía Fildes

a) Tamaño de Madures Sexual

La hembra incubante (con crías en al menos uno de sus marsupios) con el menor tamaño de testa registrado, fue de 25 mm. Por lo que, los individuos con TL mayores a este tamaño, fueron clasificados en machos y hembras según el desarrollo de marsupios dorsales (Fig. I-8).



Fig. I-8.- Identificación de individuos adultos entre machos (derecha) y hembras (izquierda) según el desarrollo de marsupios incubantes dorsales.

b) Razón de sexo, distribución de talla e incubación

La distribución de tamaño antero-posterior entre todos los individuos de *A. agassizii* muestreados, tuvo un rango entre 1 y 44 mm, mostrando una distribución unimodal con alta frecuencia de tamaños intermedios (Fig. I-9).

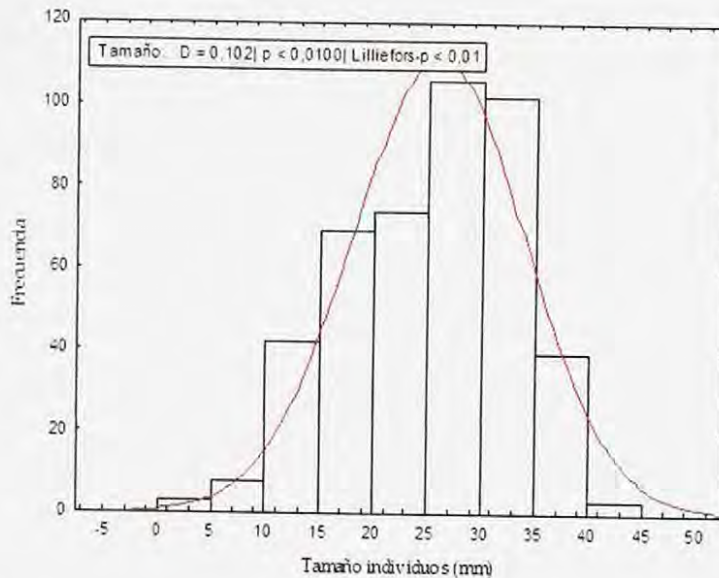


Fig. I-9.- Distribución de frecuencia de tamaños de testis (TL) de los individuos de *A. agassizii*, muestreados durante todas las campañas de terreno (2004, 2006, 2008, 2009, 2010, 2011)

El tamaño promedio de testis (TL) fue de 25.80 mm (N=447). Además, existieron diferencias de talla entre machos y hembras (test de Permutación con N: 10000, $p < 0.002$), con un TL promedio en hembras de 32.25 mm (N = 133) y en machos de 30.74 mm (N = 125).

La proporción de machos y hembras no mostró una desviación significativa a la proporción de sexos 1:1 para casi todos los años de muestreo (2004: 0.92; $p=0.75$; 2008: 1.0; $p=0.57$; 2010: 1.44; $p=0.56$; 2011: 0.6; $p=0.34$). Para el año 2009 se encontró una desviación significativa a lo esperado con una proporción de 0.3 ($p<0.05$).

La tasa de fecundidad, se consideró como el número promedio de crías por madre, el cual varió entre 22.25 y 41.83. El año 2004 no muestra una desviación estándar, ya que se consideró el total de crías por el total de madres (no todos los registros fueron hechos por madre).

Tabla I-2. Resumen de la caracterización de los individuos del sitio de estudio de *A. agassizii*. H: Hembras; M: Machos; DS: Desviación estándar;

Año	Tamaño Promedio		Fecundidad	Número de Individuos	
	H ± DS	M ± DS		# H	# M
2004	29.96±7.09	30.90±5.06	22.25	26	21
2008	31.47±8.30	30.38±3.90	29.28 ± 20.09	34	34
2009	32.19±3.61	29.75±3,61	33.64 ± 26.04	26	8
2010	34.00±3.55	30.00±4.59	43.94 ± 37.80	16	23
2011	34.24±2.87	30.39±3.53	41.83 ± 27.37	29	18

La relación entre la proporción total de crías incubadas (TC) y el tamaño de testa (TL) de la madre, fue positiva y significativa ($r^2 = 0.318$, $p < 0.001$) en el total de los datos analizados (Fig. I-10).

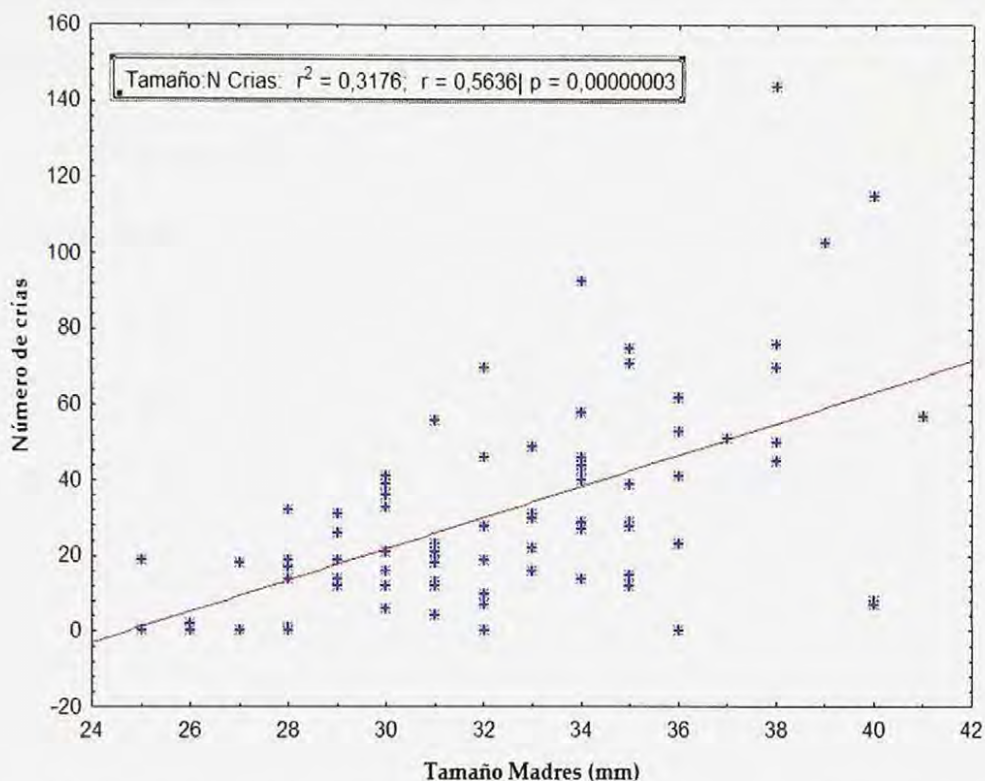


Fig. I-10.- Relación entre tamaño de testa de la madre en mm (TL) y el número de crías incubadas (TC)

c) Identificación, abundancia y distribución de los estadios de desarrollo

El criterio de identificación y discriminación de los distintos estadios de desarrollo, fue el descrito para *A. cordatus* (Schatt & Féral 1996). De los cinco estadios descritos, cuatro pudieron ser reconocidos dentro de las crías de *A. agassizii*. El estadio de Blástula - correspondiente a las etapas de segmentación y blastulación - no fue identificado en nuestras muestras, por problemas de

discriminación por efecto de la fijación y manipulación de las mismas. Debido a esto, el estadio E1 incluyó gástrula y blástulas.

El estadio de Gástrula y blástula (E1) caracterizado por una blástula de forma esférica y rodeada de una membrana de fertilización. El estadio de Postgástrula (E2) se caracteriza principalmente por una invaginación en la zona aboral (blastoporo) y una ausencia de la cobertura membranosa observada en las gástrulas. El estadio Juvenil I o temprano (E3), presentaba dos fases. Una primera fase era cercana al estadio postgástrula, caracterizada por una aparición de protuberancias del polo aboral y un aumento en el volumen; y una segunda fase más cercana al siguiente estadio, caracterizada por presencia de espinas muy pequeñas no-móviles. El último estadio observado fue el Juvenil II o tardío (E4), es la última etapa del ciclo de incubación previo a la liberación y está rodeado de espinas más largas y móviles alcanzando a medir entre 1-1.5 mm (Fig. I-11).

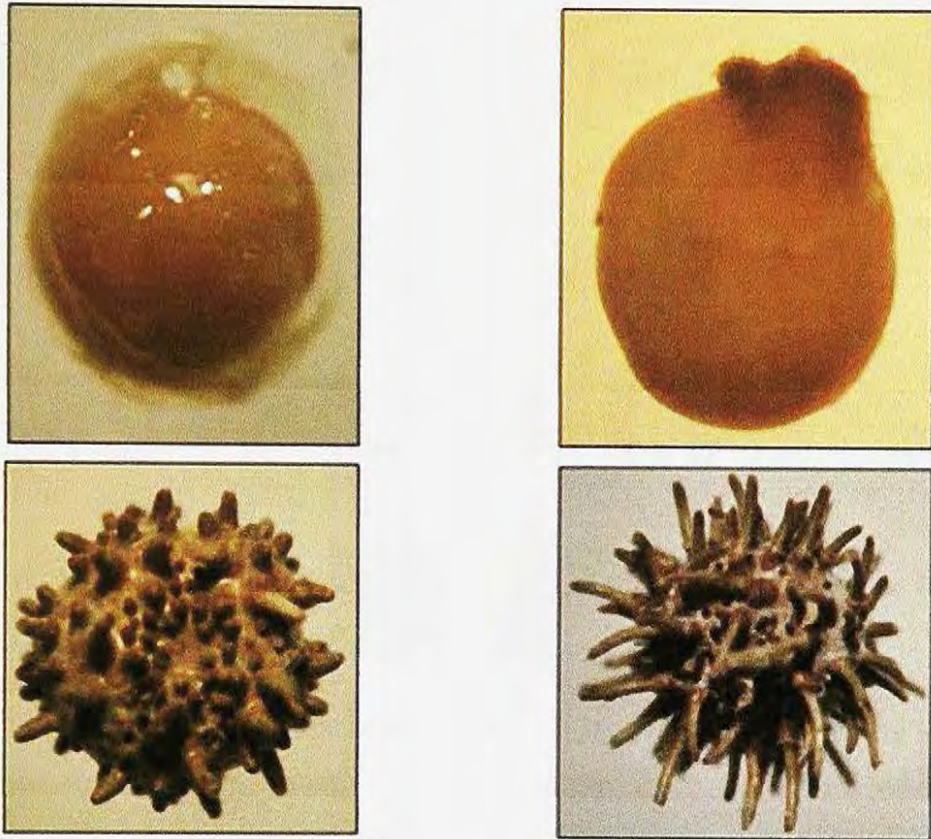


Fig. I-11.- Estadios de desarrollo de *A. agassizii*. Fila Superior. Izquierda: Gástrula (E1), Derecha: Postgástrulas (E2). Fila Inferior, Izquierda: Juvenil I (E3), Derecha: Juvenil II.

Los promedios de las proporciones de cada estadio por madre fueron calculados para cada año entre 2008 y 2011 (Fig. I-12). Para el caso del estadio E1, se observó una proporción total de 0.484 siendo el estadio más abundante, seguido por E4 con una proporción promedio de 0.390. El estadio con menor proporción fue E2 con un 0.025, seguido por E3 con 0.101 (Tabla I-3).

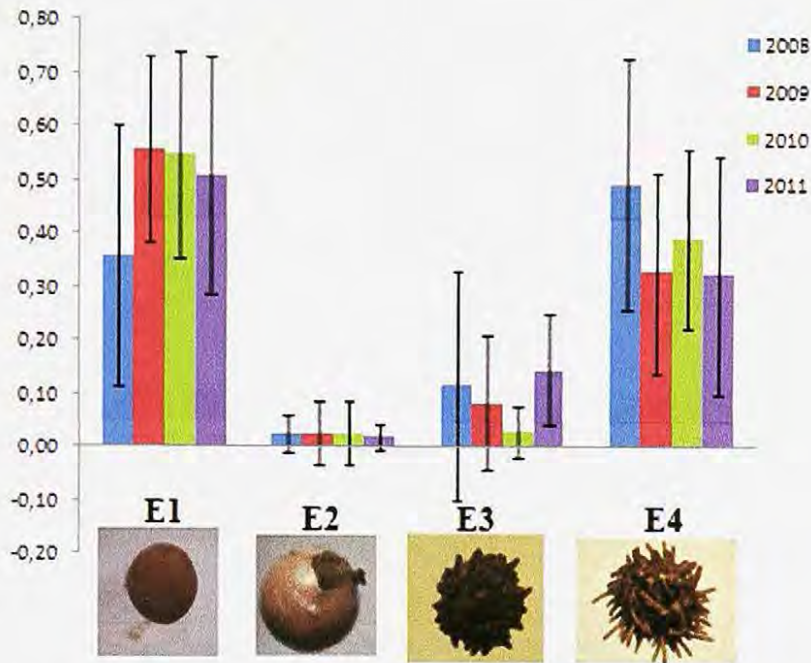


Fig. I-12.- Gráfico de las proporciones promedio de los diferentes estadíos para los 4 años de medición en *A. agassizii* de Península Ardley (PAr). Las barras verticales indican la desviación estándar de cada estadío.

Tabla I-3.- Resumen de promedios de abundancia (\bar{X}) y de proporciones por madre ($\frac{E_i}{Total}$) de los diferentes estadíos del desarrollo de *A. agassizii* reportados durante los cuatro años de muestreo.

	E1		E2		E3		E4	
	\bar{X} ± DS	$\frac{E1}{Total}$ ± DS	\bar{X} ± DS	$\frac{E2}{Total}$ ± DS	\bar{X} ± DS	$\frac{E3}{Total}$ ± DS	\bar{X} ± DS	$\frac{E4}{Total}$ ± DS
2008	10.14 ±9.20	0.360 ±0,245	1.00 ±1.72	0.026 ±0.037	2.04 ±2.44	0.118 ±0.216	16.32 ±12.03	0.496 ±0,234
2009	18.88 ±15.17	0.558 ±0,174	0.40 ±0.764	0.027 ±0.060	2.31 ±2.930	0.085 ±0.127	11.65 ±11.98	0.331 ±0.188

2010	22.19 ±15.46	0.55 ±0,194	0.5 ±1.10	0.03 ±0.059	1.25 ±2.08	0.03 ±0.047	20.00 ±22.60	0.40 ±0.17
2011	17.50 ±11.14	0.51 ±0,222	1.08 ±1.14	0.02 ±0.02	7.42 ±7.02	0.15 ±0.11	14.88 ±12.88	0.33 ±0.23
\bar{X}_{Total}	16.59	0.48	0.78	0.03	3.25	0.10	15.71	0.39
± DS	±13.60	±0.23	±1.28	±0.05	±2.81	±0.15	±3.46	±0.22

Las hembras retienen sus crías en los cuatro bolsillos incubantes protegidos por espinas superpuestas. Los bolsillos anteriores (II y IV) son más grandes que los bolsillos posteriores (I y V; Bernasconi 1966). Sin embargo, los bolsillos II y IV mostraron una cantidad promedio de crías menor, que lo arrojado por los bolsillos posteriores (I y V). Tampoco se observó una correspondencia con la posición relativa de los tres gonoporos (Fig. I-13).

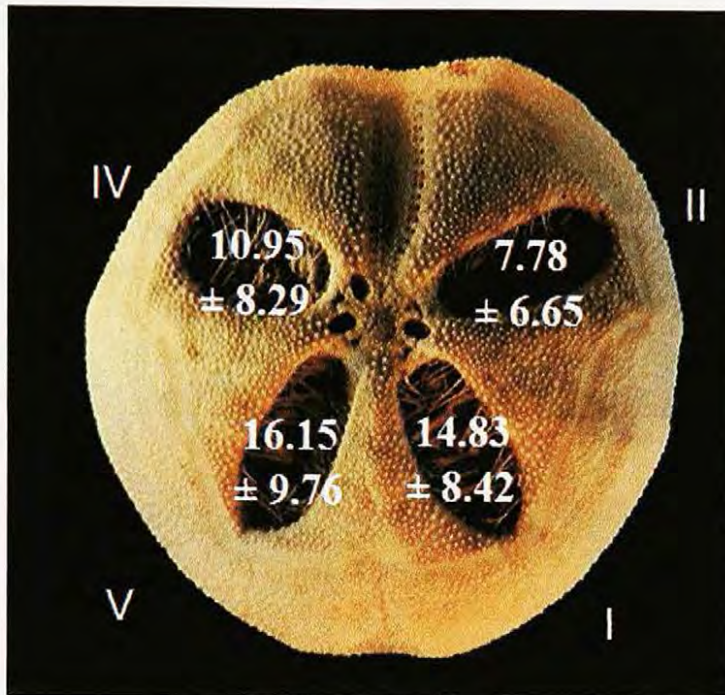


Fig. I-13. Distribución de crías en los bolsillos incubantes. Los números dentro de cada bolsillo indica promedio de crías (\pm DS, N= 111).

Tabla I-4.- Resumen de los valores de significancia (p value) de las pruebas de permutación, realizadas para la comparación entre el número de crías por bolsillo

	I	II	IV	V
I		< 0.00001	0.011	0.451
II			0.027	< 0.00001
IV				0.002

II. Determinación de ciclos reproductivos de *A. agassizii* en Bahía Fildes

Para cada hembra analizada, existieron diferencias significativas entre las proporciones de estadios observadas y esperadas, bajo el modelo nulo de ausencia de ciclo reproductivo. Todos los valores de χ^2 fueron altamente significativos (<0.000001). Estos resultados sugieren la existencia de ciclo reproductivo en todas las madres evaluadas, es decir que los eventos de fecundación se concentran en uno o varios periodos durante el año.

b) Sincronía de ciclos reproductivos

Existieron diferencias significativas entre las proporciones de los distintos estadios en cada uno de los años estudiados (2008: $F_{(3,68)} = 60.868$; $p=0.0000$; 2009: $F_{(3,52)} = 67.656$; $p = 0.000$; 2010: $F_{(3,36)} = 85.153$; $p = 0.000$; 2011: $F_{(3,68)} = 51.456$ $p = 0.000$). Estos resultados, corroboran la existencia de un ciclo reproductivo a nivel poblacional, ya que existe una sincronía entre las hembras, en la cual la mayoría de tienen el estado E1 y E4 (Fig. I-14).

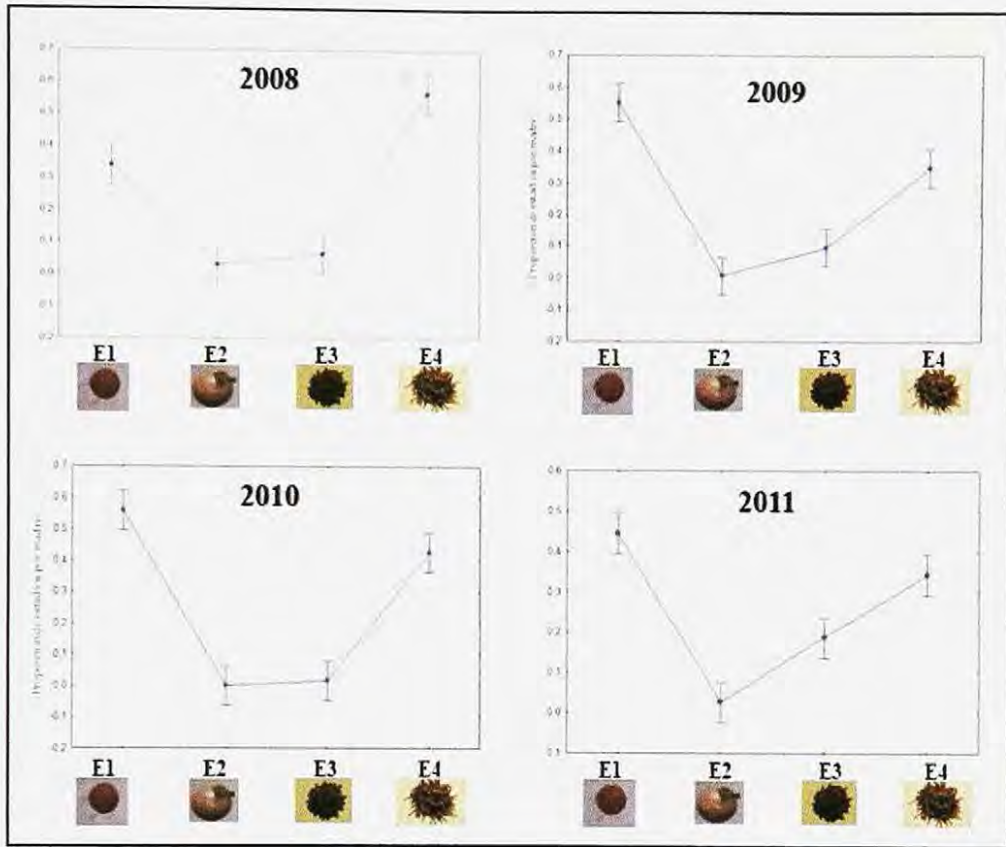


Fig. I-14.- Comparación entre proporciones de los diferentes estadios del desarrollo por madre en los cuatro años de estudio. Las barras son intervalos de confianza del 95%

c) Diferencias interanuales

Hubo diferencias significativas entre las proporciones de los estadios E1/E4 y E2/E3, en todos los años estudiados ($F_{(9,224)}: 10.322, p = 0.0001$; Fig. I-16), siendo los estadios E1 y E4 los estadios de mayor abundancia, mientras que E2 y E3 permanecieron significativamente más bajos (Fig. I-15). Estos resultados corroboran la idea de un ciclo a nivel poblacional, el cual se repetiría cada año

con marcados y significativos picos de abundancia de los estadios E1 y E4 (Fig. I-16).

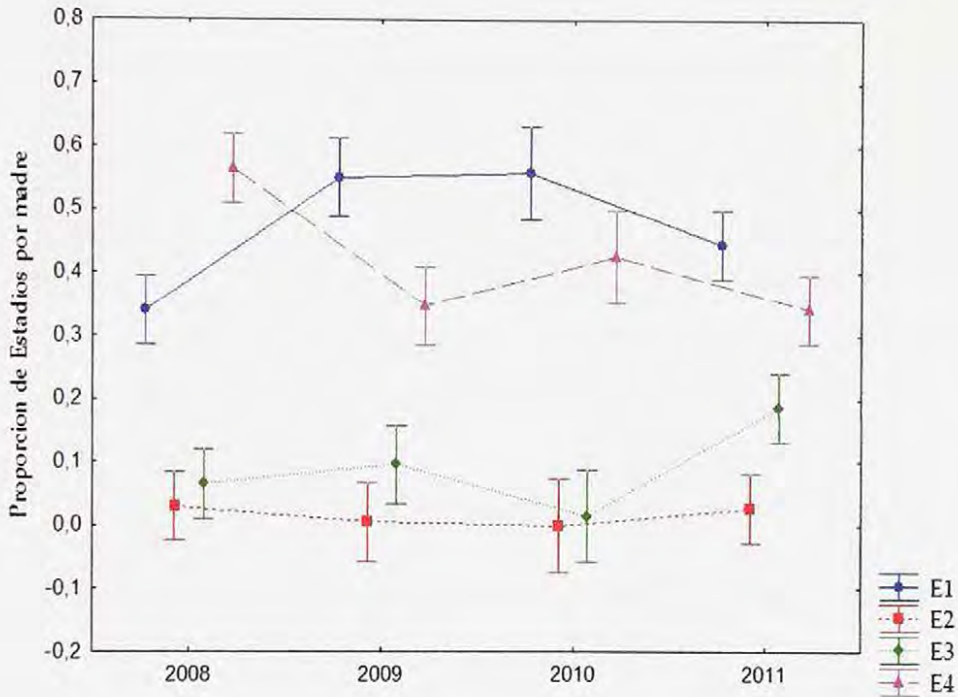


Fig. I-15.- Diferencias interanuales de las proporciones de los distintos estadios del desarrollo en *A. agassizii*. Las barras verticales son intervalos de confianza del 95%.

		E1				E2				E3				E4			
		2008	2009	2010	2011	2008	2009	2010	2011	2008	2009	2010	2011	2008	2009	2010	2011
E1	2008		***	**		****	****	****	****	****	****	****	**	****			
	2009					****	****	****	****	****	****	****	****		***		***
	2010					****	****	****	****	****	****	****	****		**		**
	2011					****	****	****	****	****	****	****	****				
E2	2008												***	****	****	****	****
	2009												***	****	****	****	****
	2010											**	****	****	****	****	****
	2011												***	****	****	****	****
E3	2008													****	****	****	****
	2009													****	****	****	****
	2010													****	**	****	****
	2011													****	*	***	**
E4	2008														***		****
	2009																
	2010																

Fig. I-16.- Resumen de Test de Tukey desigual N HSD. Cuadros rojos contienen valores significativos. **= 0.001; ***= 0.0001; ****= 0.00001

Esto – según el modelo de desarrollo de *A. cordatus* - indicaría que las hembras están empezando a liberar juveniles tardíos, probablemente provenientes de un ciclo anterior, entre 197 y hace 254 días post fertilización (dpf). A su vez, las hembras se encontrarían en proceso de gastrulación, que debió empezar entre 65 y 28 (dpf), aproximadamente.

III. Análisis comparativo de estacionalidad reproductiva de *A. agassizii*
utilizando otro sitio de estudio en Bahía Fildes

a) *Abundancia de estadios de desarrollo y ciclos reproductivos*

Al igual que lo observado en el sitio de Península Ardley (PAr), el nuevo sitio de estudio, Base China (BCh), también arrojó diferencias significativas entre estadios ($P < 0.05$) (Fig. I-17).

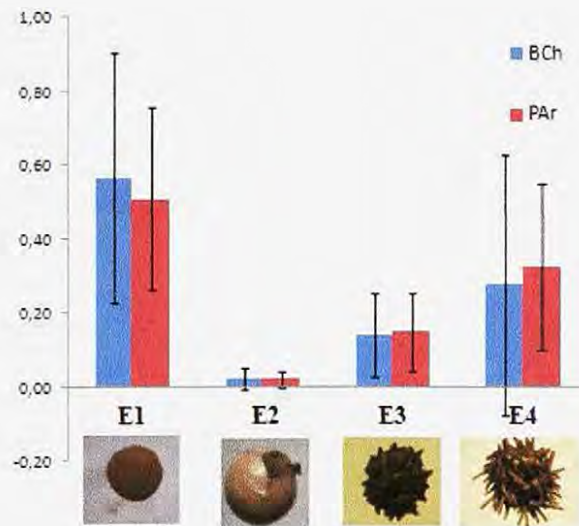


Fig. I-17.- Proporciones de los diferentes estadios del desarrollo en sitio Base China (BCh) y Península Ardley (PAr). Las barras verticales indican la desviación estándar de cada estadio.

Todas las madres evaluadas mostraron diferencias significativas entre las proporciones de estadios observadas y esperadas, bajo el modelo nulo de ausencia de ciclo reproductivo. Todos los valores de χ^2 fueron altamente significativos (<0.000001). Estos resultados sugieren la existencia de ciclo reproductivo en todas las madres evaluadas.

Con respecto a la sincronía, existieron diferencias significativas entre las proporciones de los distintos estadios ($F_{(3,16)} = 4.2834$; $p=0.02124$), sugiriendo la sincronía entre las hembras evaluadas, cuya mayoría presentaban estado E1 (Fig. I-18).

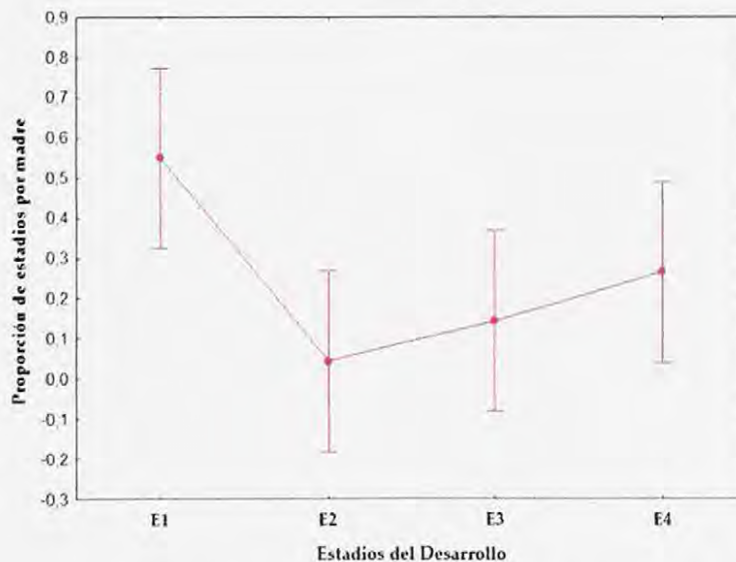


Fig. I-18.- Diferencias entre proporciones de los diferentes estadios del desarrollo por madre en *A. agassizii* en Playa de Base China (BCh). Las barras son intervalos de confianza del 95%

b) Comparación de ciclos reproductivos entre ambos sitios.

Al comparar los dos sitios para el mismo año, no se observan diferencias significativas ($F_{(3,80)}$; $p=0.5598$) con respecto a las proporciones de los diferentes estadios (Fig. I-19). Este nuevo sitio, también presentó dos picos de abundancia, correspondientes a los estadios E1 y E4.

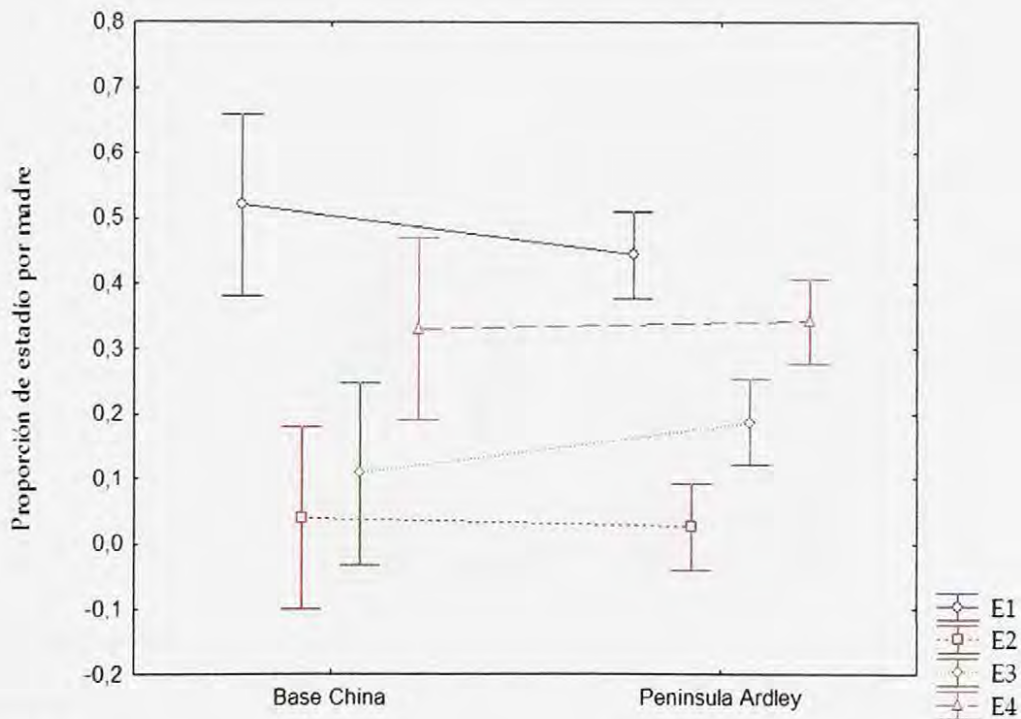


Fig. I-19.- Comparación de los diferentes estadios del desarrollo de *A. agassizii* entre los dos sitios de muestreo durante la campaña del 2011 (Base China: BCh y Península Ardley: PAr). ($F_{(3,80)}$; $p=0,5598$). Las barras verticales son intervalos de confianza del 95%.

IV. Análisis comparativo de estacionalidad reproductiva entre *A. agassizii* y *T. abatoides* en Playa de Base China en Bahía Fildes

a) Abundancia de estadios de desarrollo y ciclos reproductivos

T. abatoides también evidencia diferencias significativas entre estadios

($F_{(3,28)} = 14.053$; $p=0.00001$; Fig. I-20).

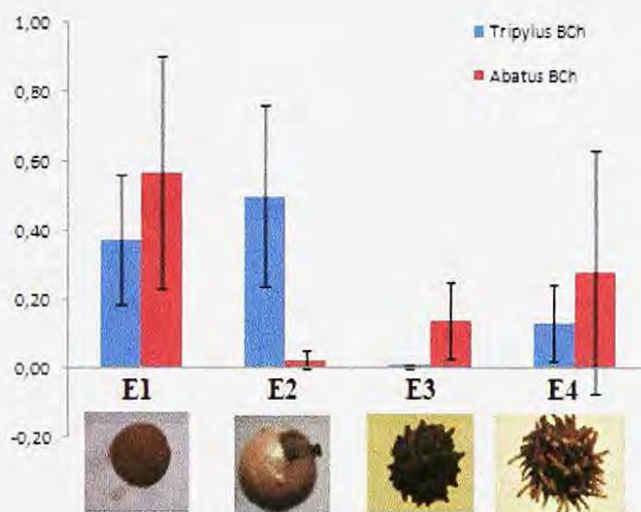


Fig. I.20.- Proporciones de los diferentes estadios del desarrollo entre *T. abatoides* y *A. agassizii* en el sitio Base China (BCh) durante la campaña del año 2011. Las barras verticales indican la desviación estándar de cada estadio.

Todas las madres de *T. abatoides* evaluadas mostraron diferencias significativas entre las proporciones de estadios observadas y esperadas, bajo el

modelo nulo de ausencia de ciclo reproductivo. Todos los valores de χ^2 fueron altamente significativos (<0.000001). Estos resultados sugieren la existencia de ciclo reproductivo en todas las madres evaluadas. Además existieron diferencias significativas entre las proporciones de los distintos estadios ($F_{(3,20)}=19.888$; $p=0.00000$). Estos resultados permiten concluir la existencia de sincronía entre las hembras, en la cual la mayoría de tienen el estado E1 y E2 (Fig. I-21).

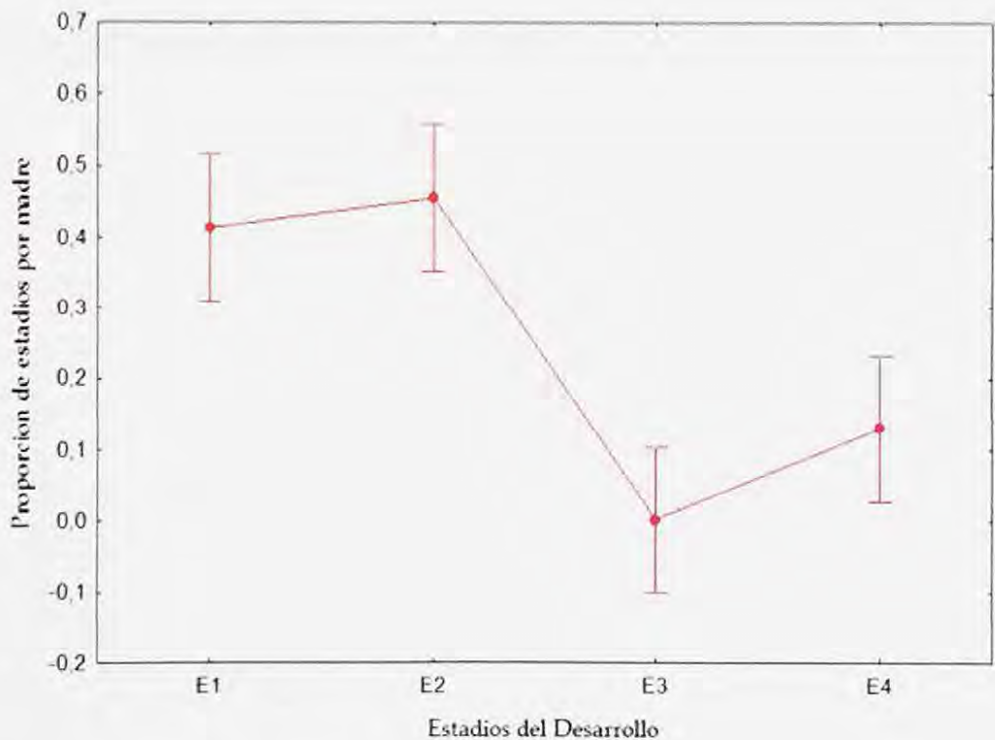


Fig. I-21.- Proporciones de los diferentes estadios del desarrollo por madre en *T. abatooides*. Las barras son intervalos de confianza del 95%

b) Comparación de ciclos reproductivos entre ambas especies

Al observar los ciclos reproductivos de ambas especies en el sitio de estudio Base China, se observan diferencias significativas entre los estadios más abundantes ($F_{(3,44)} = 9.1811$; $p=0.00008$). Las mayores diferencias fueron registradas en E2 entre *A. agassizii* y *T. abatoides* ($p=0.001896$). Además ambas especies presentaron una alta proporción de E1 (Fig. I-22). Esto último, podría sugerir que las hembras están en etapa de blastulación-gastrulación (entre 28 y 65 dpf) y en postgastrulación (entre 65 y 130 dpf).

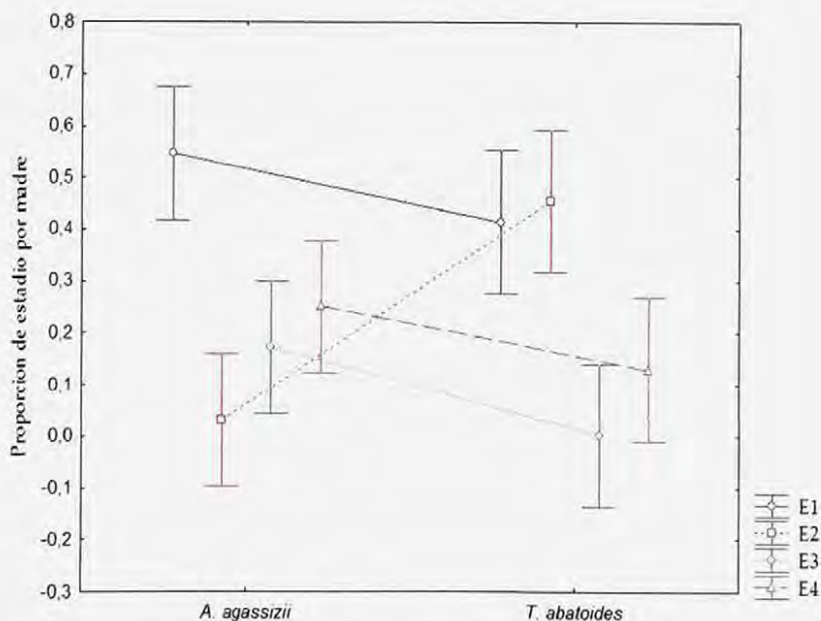


Fig. I-22.- Comparación de los diferentes estadios del desarrollo entre especies en el mismo sitio de muestreo durante la campaña del 2011. ($F_{(3,44)} = 9.1811$; $p=0.00008$). Las barras son intervalos de confianza del 95%

Para *A. agassizii* los estadios más abundantes correspondieron a E1 y E4, mientras que para *T. abatoides* estos fueron E1 y E2, con promedios de 0.373 y 0.497, respectivamente (Tabla I-6).

V. Calendarización del ciclo reproductivo en Bahía Fildes

De acuerdo a lo observado en los cuatro años de estudio en el sitio de Península Ardley, esta población de *A. agassizii* tendría dos eventos de fecundación, dado por los picos de abundancia de los estadios E1 y E4. La calendarización de los eventos de reproducción fueron obtenidos bajo el modelo de desarrollo propuesto por Schatt y Féral (1996) para *A. cordatus*, los cuales corresponderían a un pulso en Junio y otro en Diciembre (Fig. I-23).

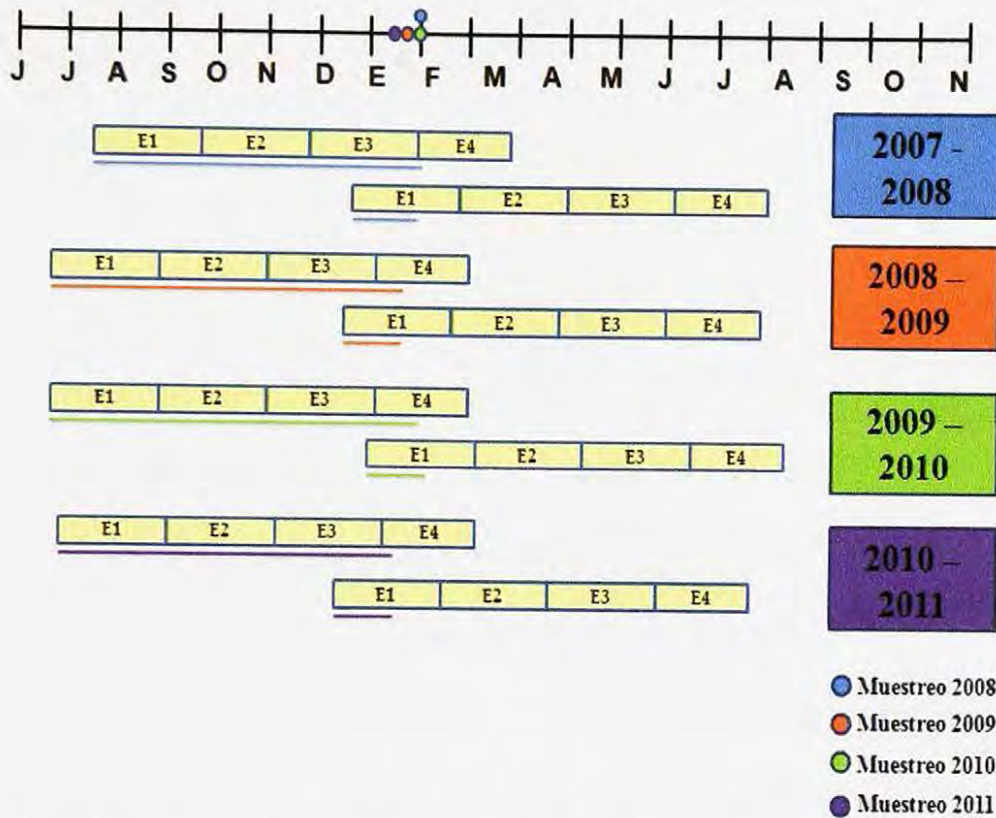


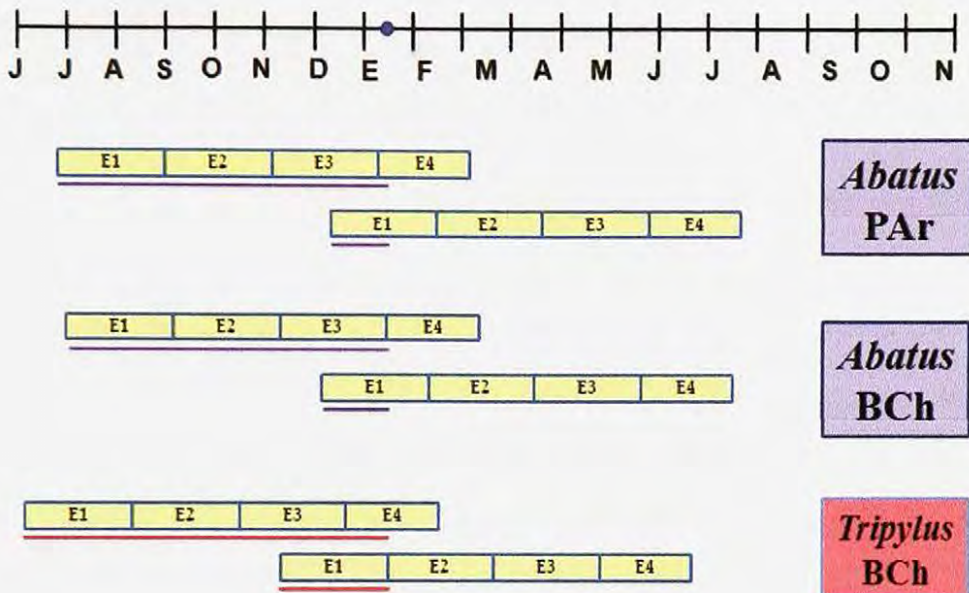
Fig. I-23.- Calendarización de los dos ciclos reproductivos de *A. agassizii* en los diferentes años muestreados. Muestreo 2008: 01/02; Muestreo 2009: 20/01; Muestreo 2010: 01/02; Muestreo 2011: 14/01

Para el año 2007, estimados a partir del muestreo del año 2008, se obtuvo un primer ciclo comenzando la segunda quincena del mes de Julio (15 de Junio \pm 15 días), mientras que el segundo ciclo empezaría durante la segunda parte del mes de Diciembre (23 de Diciembre \pm 13). Para el año 2008, estimados a partir del muestreo del año 2009, se obtuvo un primer ciclo que habría comenzando la segunda quincena del mes de Junio (21 de Junio \pm 14), mientras que el segundo

ciclo habría empezado durante la última la segunda quincena del mes de Diciembre (17 de Diciembre \pm 5 días). Para el año 2009, estimados a partir del muestreo del año 2010, se obtuvo un primer ciclo que habría comenzando terminando el mes de Junio (21 de Junio \pm 9 días), mientras que el segundo ciclo habría empezado durante la última parte del mes de Diciembre (28 de Diciembre \pm 0 días). Para el año 2010, estimados a partir del muestreo del año 2011, se obtuvo un primer ciclo que habría comenzando el mes de Junio (25 de Junio \pm 5 días), mientras que el segundo ciclo habría empezado durante la primera parte del mes de Diciembre (9 de Diciembre \pm 15 días).

En el sitio Playa de Base China (BCh), también se obtuvieron dos ciclos reproductivos para *A. agassizii*, cada uno con sus respectivas fechas de inicio y su error. Para el año 2010, estimados a partir del muestreo del año 2011, se obtuvo un primer ciclo el 01 de Julio (\pm 24 días), mientras que el segundo ciclo empezaría el 04 de Diciembre (\pm 21 días).

Para *T. abatoides*, en este mismo sitio y año, también se obtuvieron dos ciclos reproductivos. El primer ciclo habría empezado el 07 de noviembre (\pm 15 días) y el segundo el 04 de junio (\pm 0 días; Fig. I-24).



● Muestreo 2011

Fig. I-24.- Calendarización de los dos ciclos reproductivos de *A. agassizii* y *T. abatoides*. Se muestran las comparaciones entre sitio de muestreo (PAR vs BCh) durante la campaña del 2011 y entre especies en el mismo sitio BCh. El muestreo fue realizado el día 14 de enero.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio señalan la existencia de un ciclo reproductivo en cada una de las hembras evaluadas, con evidencia de sincronía entre ellas. Esto ciclos tendrían dos pulsos reproductivos durante el año, concentrados durante Julio (invierno) y Diciembre (verano). Estos resultados se asemejan a lo observado en las especies hermanas subantárticas *A. cordatus* (Magniez 1983, Schatt & Féral 1991, 1996) y *A. cavernosus* (Gil 2009).

Para el caso de *A. cordatus*, endémico de las Islas Kerguelen, Schatt (1984) detecta dos pulsos reproductivos, uno principal entre Marzo-Abril (otoño) y uno secundario a comienzos de Octubre (primavera). Para el pulso principal, los juveniles se liberarían durante el mes de Febrero (verano), mientras que para el pulso secundario, los juveniles se liberarían en Junio (invierno). Sin embargo, esta calendarización de los ciclos reproductivos presentó variaciones temporales entre diferentes regiones geográficas alrededor de la isla principal (Schatt &

Féral 1989, 1991). Esto demostraría que los pulsos reproductivos en el género *Abatus* son bastante variables entre poblaciones.

Por otra parte, Gil (2009) estudió los ciclos reproductivos de una población de *A. cavernosus* en el sur de la Patagonia argentina. Este estudio, detecta sólo un pulso reproductivo durante Mayo-Julio, con una liberación de juveniles durante el mes de Enero (verano).

Estos resultados son contrastantes con lo observado en las especies hermanas antárticas *A. shackletoni* y *A. nimrodi*. Pearse y McClintock (1990) estudiaron ambas especies en la Bahía McMurdo y observaron poca variación temporal en los índices gonádicos y presencia de todos los estadios de desarrollo en los bolsillos incubantes de la madre, sugiriendo una reproducción continua durante todo el año. Este escenario sería habitual en otras especies de la zona con desarrollo lecitotrófico, en contraste con otras especies de desarrollo planctotrófico con periodos de pulsos reproductivos más restringidos (Pearse & McClintock 1990).

En las regiones subantárticas, existe una fuerte variación de los factores exógenos (*i.e* la temperatura, fotoperiodo, ciclo lunar y disponibilidad de alimento). Estudios en fauna bentónica realizados en estas regiones, han descrito una alta variación de temperatura durante el año (Branch *et al.* 1993, Gil 2009,

Kang 2009), cambios en el fotoperiodo y una concentración total de clorofila que varía irregularmente a lo largo del año con un aumento significativo del fitoplancton durante un corto período entre Septiembre – Octubre y Diciembre – Enero (Ahn *et al.* 2003, Hernando 2006, Kang *et al.* 2009, Pérez *et al.* 2010). En este contexto, las dos especies subantárticas mostrarían un ciclo anual en el cual la mayor cantidad de crías incubadas son liberadas durante verano, posiblemente para aprovechar el aumento de la productividad primaria y proveer nutrición y crecimiento a los juveniles (Magniez 1983, Schatt 1985, Pearse *et al.* 1986, Schatt & Féral 1991, Poulin & Féral 1995). En contraste, estas variaciones ambientales no estarían presentes en la Antártica continental. En particular, la Bahía de McMurdo muestra una temperatura superficial del agua que varía solamente entre -2.0 y -1.7°C, con una cantidad de material orgánico en el sedimento relativamente estable a lo largo del año (Pearse *et al.* 1986). En este caso, las especies antárticas tendrían liberación constante de los juveniles, posiblemente debido a una menor estacionalidad ambiental. Sin embargo, nuestros resultados señalan, que a pesar de encontrarse en la región de la Península Antártica, la especie *A. agassizii* presenta un ciclo anual con evidencia de sincronía poblacional y dos pulsos de reproducción. Es decir, esta especie antártica presentaría un ciclo reproductivo más parecido al de una especie subantártica.

Una posible explicación para este fenómeno, es la variación ambiental de las Islas Shetland. La antártica no es un sistema homogéneo, ya que podemos encontrar zonas de baja variación en los factores ambientales, así como también aquellas que presentan fluctuaciones con importantes alzas en la productividad primaria y temperatura. En este sentido, Tréguer y Jacques (1992) dividieron el Océano Austral en zonas de acuerdo a su patrón de cobertura de hielos y productividad primaria. 1). Zona cercana a la costa, constantemente cubiertas por hielo, (*Permanent Ice Zone*); 2) Zona fuera de PIZ, donde el hielo se forma cada invierno y se derrite en primavera, (*Seasonal Ice Zone*) y 3) Zona hacia fuera de SIZ, donde solo hay mar abierto (*Permanently Open-Ocean Zone*). Cada una de estas zonas presentan diferentes regímenes temporales de luz y cobertura de hielo, los cuales gatillan diferentes patrones de estacionalidad en la producción primaria (Clarke 1988), donde el pulso de materia orgánica en el bentos está diferencialmente limitada en el tiempo (Grange 2004).

Las Islas Shetland, en particular la Bahía Fildes en Isla Rey Jorge, presenta una importante variación en los principales factores ambientales, como la temperatura superficial del agua, que varía entre $-1.96\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $2.86\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el periodo 2007-2010 (datos no publicados, Fig. I-25) y la concentración total de clorofila, que registra variaciones de 0.1 a $12.2\text{ }\mu\text{g/L}$ a lo largo del año (Kang

2009). Además, estas oscilaciones se han incrementado durante los últimos años debido al fuerte impacto del calentamiento global sobre la Península Antártica (Clarke *et al.* 2006, Schofield 2010).

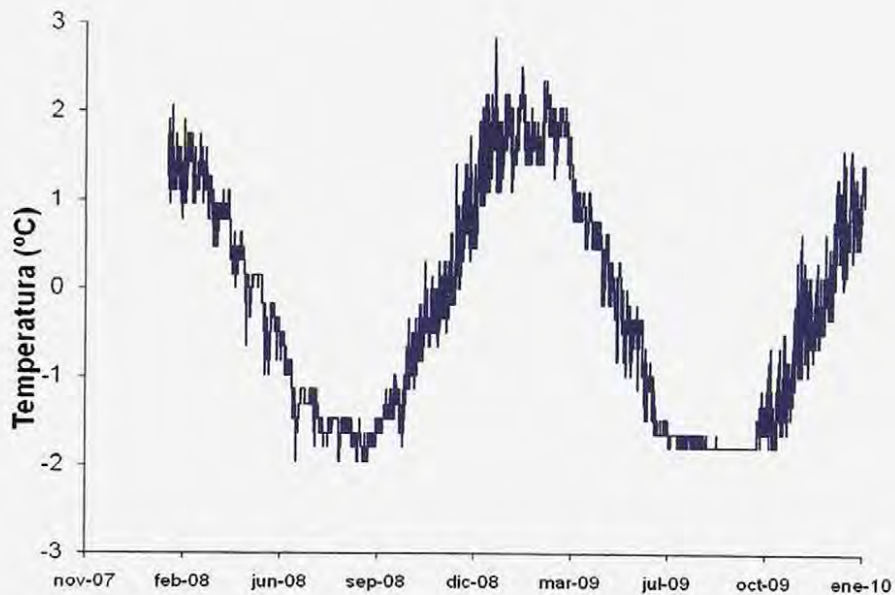


Fig. I-25.- Representación gráfica de las variaciones en la temperatura de la superficie del agua registradas durante febrero 2008 y febrero 2010.

Finalmente, las Islas Shetland del Sur (Península Antártica), tendrían características más similares a las observadas en regiones subantárticas, que las observadas en el Mar de Ross (Antártica Continental). Por lo que la especie *A. agassizii* de Islas Shetland, estaría experimentando mayor variación ambiental que aquellas especies congénéricas *A. nimrodi* y *A. shackletoni* de McMurdo. Esto

podría indicar que las variaciones anuales de estos factores exógenos estarían generando una fuerte ciclicidad en la reproducción de *A. agassizii*. En este mismo sentido, el patrón de ciclicidad se extiende a otras poblaciones de *A. agassizii*, (*i.e* individuos de distintos sitios de muestreo presentan mismo ciclo). Incluso a otras especies, como el caso de *T. abatooides* que también mostró un ciclo reproductivo anual con dos pulsos de liberación de gametos.

Una segunda explicación se refiere a la similitud genética de *A. agassizii* con las especies hermanas de la región Subantártica. La filogenia de máxima parsimonia realizada en la familia Schizasteridae utilizando el gen Citocromo Oxidasa Subunidad 1 (Tesis Magíster Angie Díaz, 2008), posiciona a *A. agassizii* en un clado conformado por las dos especies subantárticas (*A. cordatus* y *A. cavernosus*). Las especies antárticas (*A. nimrodí* y *A. shackletoni*) - por el contrario - quedan en dos clados distintos y separados entre sí (Fig. I-26). Estos resultados podrían indicar una inercia filogenética en el determinismo de los ciclos reproductivos.

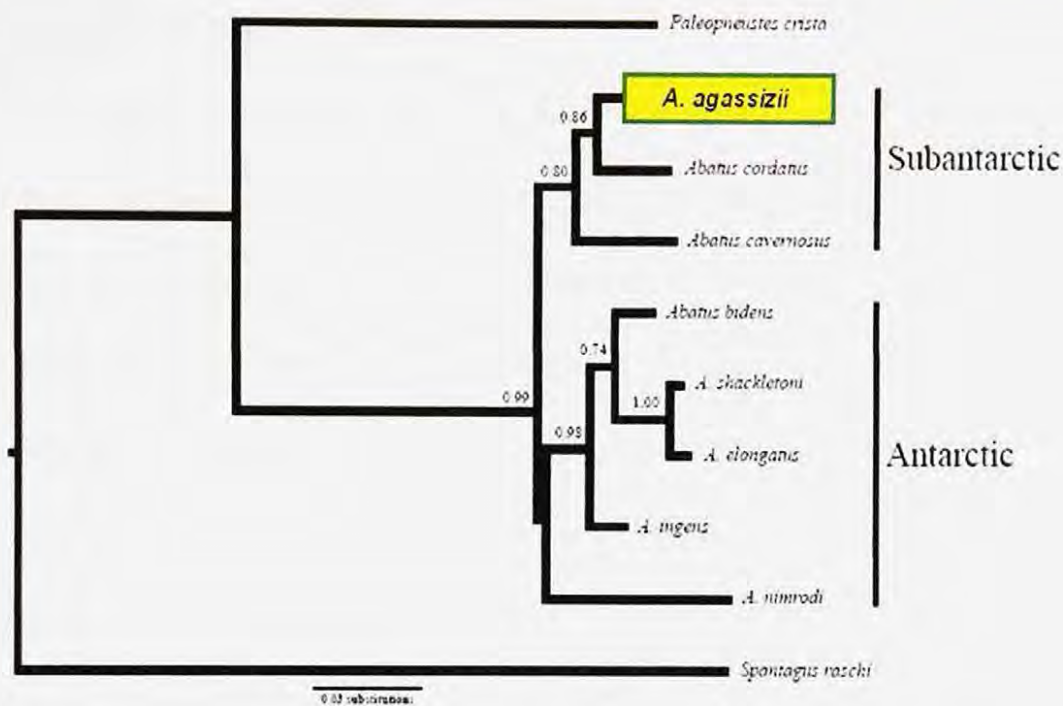


Fig. I-26.- Reconstrucción filogenética de la familia Schizasteridae realizada a partir del ADN mitocondrial (COI).

En adición a esto, *A. agassizii* tiene una distribución bastante restringida en la Península Antártica, ya que sólo se ha encontrado una población en Bahía Fildes, a pesar del esfuerzo de muestreo que se ha realizado en numerosas expediciones entre 2004 y 2011. Asimismo, esta especie tiene registro de haberse encontrado en las Islas Georgia del Sur, lo cual permite pensar que esta especie habría colonizado las Islas Shetland desde zonas subantárticas durante el proceso de transición entre el último periodo glacial y el actual interglacial. El

éxito de sobrevivencia que habría tenido esta especie, se debería principalmente, a las características actuales del medio ambiente de la zona, similares en varios aspectos con las regiones subantárticas.

Por último, cabe mencionar que las duraciones de los distintos estadios del desarrollo de las crías de *A. agassizii*, pueden diferir con respecto a lo descrito para el ciclo reproductivo y de incubación de su especie hermana (*A. cordatus*). Frente a esta observación, una alternativa para la duración del ciclo de incubación de *A. agassizii* sería de 14 a 15 meses desde el pulso de reproducción de Diciembre hasta su liberación en los meses de verano (Febrero-Marzo). Esta duración de ciclo de incubación explicaría el hecho que en los meses de muestreo (Enero-Febrero) observemos dos picos de abundancia, lo que representaría el solapamiento del estadio E1 del nuevo ciclo, más los individuos E4 del ciclo anterior. En invertebrados marinos antárticos, se han descrito tasas metabólicas más bajas y largos períodos de desarrollo (Pearse et al. 1991, Peck et al. 2006a, b). Una forma de comprobar esta alternativa, sería observar los estadios de desarrollo de las crías incubadas durante el invierno (Agosto), en donde debiéramos encontrar – principalmente - estadios E2 y E3.

II CAPITULO

PATRON DE APAREAMIENTO Y MULTIPATERNIDAD EN *A. agassizii*

INTRODUCCIÓN

Los eventos de fecundación en el mar conllevan evidentes obstáculos que han sido asociados a la evolución de distintas estrategias reproductivas, las cuales se traducen en asegurar una mayor eficacia del espermatozoide en llegar al huevo. Distintos modos reproductivos aseguran una mayor fecundidad (porcentaje de huevos fecundados), lo que permite así evaluar el comportamiento y éxito reproductivo de los individuos de una especie.

La fertilización exitosa en invertebrados marinos, está modulada por una serie de mecanismos que incluye conductas asociadas a la agregación, pseudocopulación (Pennington 1985, Run *et al.* 1988, Levitan *et al.* 1991, Levitan *et al.* 1992, Hamel & Mercier 1995), la sincronización en la liberación de gametos, generalmente asociada a variables ambientales (Giese & Kanatani 1987, Giese *et al.* 1991) y mecanismos endógenos, como tipo de gametos/gónada, forma de desarrollo y sistema neuro-endocrino de respuesta a estímulos (Miller 1989, Young 1999). Asimismo, estos mecanismos, se encuentran influenciados por

algunos factores, como la densidad, tanto en la población de machos como de la esperma, el tamaño poblacional y corporal de los adultos, la distribución de los individuos y su sincronía en el momento de la liberación de gametos (Pennington 1985, Pearse *et al.* 1991, Levitan *et al.* 1991, Levitan *et al.* 1992, Levitan & Petersen 1995, Powell *et al.* 2001, Levitan 2005).

La liberación de gametos o "*spawning*" es uno de los eventos del ciclo reproductivo cuyos tiempos y periodicidad también varían en función de factores endógenos y exógenos (Baker 1938, Clarke 1979, Olive 1995, Mercier & Hamel 2009). Sin embargo se ha definido tres formas principales de spawning (Tabla II-1), (Havenhand & Styan 2009, Kamel *et al.* 2010). Una primera forma de liberación es del tipo "*broadcaster*", en la cual ambos gametos son liberados a la columna de agua y la fertilización ocurre externamente. Una segunda forma se ha denominado "*copulatory*", ya que hay una liberación de espermios directamente a las hembras mediada por estructuras o algunas conductas del tipo copulatorias (pseudocopulación en estrellas de mar Slaterry & Bosh 1993, copulación en gasterópodos, Paterson *et al.* 2001, hectocótilo en cefalópodos Voight & Feldheim 2009, espermatóforo en langostinos Yue & Chang 2010). Una tercera modalidad es del tipo "*spermcast*" (Pemberton *et al.* 2003, Bishop & Pemberton 2006), la cual involucra una retención de los gametos por parte de la

hembra (huevos) y una liberación de los gametos del macho (esperma) a la columna de agua (Bishop 1996, Addison & Hart 2005, Marshall & Evans 2005, Bishop & Pemberton 2006, Johnson & Yund 2007, Serrão & Havenhand 2009, Kamel 2010). En consecuencia, la fecundación ocurre sobre o al interior de la hembra (Fell 1946, Schinner & McClintock 1993, David *et al.* 2005, Sewell 2011,) por medio de una recepción pasiva de esperma de múltiples padres potenciales, traduciéndose en una mayor tasa de fecundación que las especies del tipo “broadcaster” (Pemberton *et al.* 2003, Johnson & Yund 2007). La mayoría de las especies que presentan esta modalidad son incubantes, a excepción de algunos briozoos (*Membranipora membranacea*: Temkin 1994, *Electra pilosa* y *Alcyonidium sp.*: Temkin 1996) y esponjas (Maldonado & Bergquist 2002) que liberan los cigotos tras una fertilización interna. La liberación de un solo tipo de gametos se ha observado en organismos sésiles (Yund & McCartney 1994, Johnson & Yund 2004), de baja dispersión o con desarrollo de espermiotecas (Marshall & Evans 2005, Kamel 2010), los cuales experimentan una promiscuidad obligada o patrones de apareamiento múltiple (“*multiple mating*”).

Tabla II-1.- Resumen de los principales modos de liberación de gametos de macho y hembras y su asociación en invertebrados marinos.

Spawning Macho (espermios)	Spawning Hembra (huevos)			
		Libre	Protegido (interior madre)	Protegido (cápsulas)
	Libre	Broadcaster	Spermcast	Spermcast
Protegido (espermatóforo)	X	Copulatory	X	

Tradicionalmente, el sistema de apareamiento o *"mating system"* se define como los caracteres reproductivos que determinan los patrones de apareamiento en los organismos, es decir quien se aparea con quién y cómo lo hacen (Barrett & Eckert, 1990; Barrett *et al.*, 1996; Vogler & Kalisz, 2001). Algunas de las modalidades en estos patrones de apareamiento son la poliginia, en la cual un macho tiene múltiples hembras en un mismo periodo reproductivo; contrario a la poliandria, en la cual las hembras tienen múltiples machos (Sinervo 1997). Estas modalidades de apareamiento han sido reportadas en numerosos taxa (Plantas: Mitchell 2005; Anfibios: Myers & Zamudio 2004; Reptiles: Laloi *et al.* 2004; Peces: Soucy & Travis 2003; Aves: Fossøy *et al.* 2007; Parásitos: Cutullé

2010; Insectos: Boomsma 1999, Arnquist & Nilsson 2000; Moluscos: Shaw & Sauer 2004, Tesis Brante 2007, Mäkinen *et al.* 2007 Voight 2009, Walker *et al.* 2007; Crustáceos: Toonen 2004, Yue & Chang 2010, Yue *et al.* 2010).

Algunas de las hipótesis que han explicado el origen evolutivo de la poliandria han sido referidas a los beneficios directos (no-genéticos) e indirectos (genéticos) que tendrían las hembras (Newcomer 1999, Jennions & Petrie 2000, Fossey *et al.* 2007, Marshall & Evans 2005). Los beneficios directos descritos en algunas especies de aves, han sido expandir el rango de forrajeo de la hembra al facilitarse su entrada en los territorios de machos extras, aumentar su defensa al ataque de depredadores (Gray 1997) y aumentar el cuidado parental (Blomqvist *et al.* 2005). En otras especies, se ha planteado que la poliandria aseguraría el éxito de fecundación de los huevos, otorgando un mayor éxito reproductivo a las hembras (Aves: Sheldon 1994; Insectos: Tregenza *et al.* 1998; Poliquetos: Marshall & Evans 2005 y revisado por Yasui 1998 y Simmons 2005). Alternativamente, las hembras también podrían tener beneficios indirectos, como maximizar la calidad genética de la descendencia escogiendo a aquellos machos portadores de los mejores genes (hipótesis de los "buenos genes") o bien complementando los suyos (hipótesis de "genes compatibles") (Møller & Birkhead 1998, Møller & Thornhill 1998, Fossey *et al.* 2007). Además tendría

efecto en la diversidad genética, ya que – al aumentar el número de machos que fecundan a una misma hembra (Multipaternidad) – existe una mayor probabilidad de aportar nuevos alelos a la descendencia (Johnson & Yund 2007, Cutullé *et al.* 2009, Serbezov *et al.* 2010) y evitar los efectos negativos de la endogamia (Stockley *et al.* 1993, Pusey & Wolf 1996, Tregenza & Wedell 2002). En el caso particular de los invertebrados marinos, son estos dos últimos beneficios indirectos los que explicarían de mejor manera el origen evolutivo de la poliandria.

Al existir una retención de gametos - ya sea por parte de las hembras o en algún tipo de estructuras (cápsulas) - y un escaso movimiento de los adultos, las hembras de especies del tipo “*spermcast*” y “*copulatory*” tienen un número limitado de machos posibles para la fecundación de sus gametos, contrario con lo que ocurre en aquellas hembras de especies “*broadcaster*”, en las cuales sus gametos tiene un mayor número de machos posibles para su fecundación (Johnson & Yund 2007). La ausencia de dispersión de los huevos, la rápida dilución y corta longevidad de los espermatozoides en el agua (Levitan & Petersen 1995, Yund 2000, Levitan 2000, Pemberton *et al.* 2003, Levitan 2004) y la poca movilidad de las especies bentónicas, permite pensar que el número de machos potenciales estaría determinado por factores poblacionales como el tipo

de distribución y la densidad (Levitan *et al.* 1992, Levitan & Young 1995, Yund 2000, Levitan 2002, Levitan 2004, Marshall & Evans 2005). De estos estudios se puede desprender que 1) el nivel de poliandria dependería de la distribución espacial de los machos, ya que solo los más cercanos a las hembras serían exitosos en fecundar (Yund & McCartney 1994, Yund 1998, Atkinson & Yund 1999) y 2) en el caso de las especies sésiles o de poca vagilidad, que además no poseen un estadio de dispersión, ocurriría un aumento del nivel de endogamia, debido a la generación de estructuras familiares (*kingroups*) en las proximidades (Poulin & Féral 1995, Yund & O'Neil 2000). En este sentido, se espera que en poblaciones de alta densidad, la descendencia de una madre sea el resultado de la fecundación de varios machos (Alta Multipaternidad); mientras que cuando hay una baja densidad, se espera que un macho o un número bajo de machos hayan participado de la fecundación (Baja Multipaternidad).

En paralelo, se han descrito algunas estrategias conductuales que aseguran el éxito reproductivo de especies de invertebrados marinos (Run *et al.* 1988, Slattery & Bosch 1993, Levitan 1998, Yund 2000, Campbell *et al.* 2011). Estas conductas apuntan hacia el aumento de densidad poblacional y/o espermática, siendo la sincronía de liberación de gametos y la agregación algunas de las más documentadas en equinodermos, (Pearse 1988, Starr *et al.*

1990, Chenuil 2004). Nada se conoce de las estrategias reproductivas conductuales en *Abatus*, sin embargo Chenuil (2004) plantea que podrían estar asociadas al acercamiento entre machos y hembras durante el periodo de reproducción, como se ha observado en equinodermos (Slattery & Bosh 1993, Selvakumaraswamy & Byrne 2000, Campbell *et al.* 2001), incluso en equinoideos Schizasteridae (Buchanan 1966).

La determinación de los patrones de apareamiento y de los sistemas de reproducción en invertebrados marinos conlleva dificultades propias al sistema de estudio. Las observaciones de copulación de hembras con uno o varios machos, permiten establecer algunos patrones de apareamiento, sin embargo no permiten medir si estas conductas conllevan a una paternidad efectiva (Laloi *et al.* 2004). Además muchas especies exhiben progenies o camadas numerosas, las cuales dificultan la evaluación del éxito reproductivo de machos específicos (Levitan *et al.* 1995) y su variación entre individuos (Blouin 2003, Jones 2005).

El desarrollo de marcadores moleculares, en particular los microsatélites, ha posibilitado la apertura de nuevas posibilidades de medición en comparación con las observaciones previas. Desde los primeros estudios en poblaciones naturales (Ellegren 1991, 1992, Schlotterer *et al.* 1991), los microsatélites se han convertido en los marcadores más utilizados y los de mayor aplicación en

genética de poblaciones y ecología molecular (Ritland 2000, Stapley *et al.* 2003, Herráeza *et al.* 2005, Aspi *et al.* 2006, Cegelski *et al.* 2006, Hansson 2010). Además, existe un extenso conocimiento en los aspectos generales de su uso (Jarne & Lagoda 1996, Selkoe & Toonen 2006, Väli *et al.* 2008), desarrollo (Zane *et al.* 2002) y evolución (Ellegren 2000, 2004). Los microsatélites son secuencias repetidas en tándem cuya unidad de repetición es entre una y cinco pares de bases. Se heredan de forma mendeliana y son codominantes, segregan independientemente en cada locus y presentan un alto nivel de polimorfismo, medido por los tamaños de los diferentes alelos (Jarne & Lagoda 1996, Sunnucks 2000).

La mayoría de las especies del tipo spermcast incuban a sus crías, lo que representaría ser un modelo adecuado para la reconstrucción de genotipos parentales. En particular, la determinación del número mínimo de machos que contribuyen a la diversidad genética observada en la descendencia (*i.e.* multipaternidad) ayuda a evaluar el tipo de apareamiento reproductivo. Este tipo de análisis de paternidad es uno de los más usados en estudios de ecología molecular (Jones 2001, 2005, Johnson & Yund 2007, Mäkinen *et al.* 2007, Jones *et al.* 2009, Voight & Feldheim 2009, Yue & Chang 2010) y pueden ser realizados con cualquier tipo de marcador molecular lo suficientemente polimórfico

(Gerber, 2000). A pesar de que existen alternativas en el uso de marcadores para realizar este tipo de estudio (RAPD, AFLP), los cuales han sido utilizados previamente en análisis de paternidad (Levitan 1993, Chenuil *et al.* 2004), la herramienta genética más poderosa para realizar este tipo de estudios para la mayoría de los sistemas biológicos son los microsatélites. De hecho, los avances más recientes en técnicas, aplicación y análisis de resultados han sido desarrollados para estudios utilizando este tipo de marcador (Blouin 2003, Jones & Ardren 2003, Selkoe & Toonen 2006, Hess *et al.* 2011).

Debido a que en el erizo incubante *A. agassizii* la maternidad está establecida, distintos análisis de parentesco pueden ser realizados. En particular, este trabajo pretende conocer la modalidad de apareamiento y determinación de los niveles de multipaternidad a través de la reconstrucción de los genotipos de los posibles padres. Además se realizará un estudio espacial utilizando un transecto de 20m para conocer la estructura familiar y testear si la modalidad de reproducción esta mediada por la densidad de los individuos.

De los antecedentes previamente expuestos, se desprenden las siguientes hipótesis de trabajo.

1) Patrón de Apareamiento & Nivel de Multipaternidad

Debido a la retención de los huevos por parte de las hembras, limitaciones de la esperma y a la baja vagilidad de los adultos, las crías incubadas por una misma hembra provendrían de la fertilización de un número muy limitado de machos (Bajo nivel de Multipaternidad)

Por lo tanto se predice que: existirá un bajo número de genotipos parentales reconstruidos por camada evaluada.

2) Densidad poblacional y Nivel Multipaternidad

El número de machos que participan de un evento de fecundación depende de la densidad poblacional.

Por lo tanto se predice que: el nivel de multipaternidad en el patrón aislado (baja densidad) sería más bajo que en el patrón agregado (alta densidad)

3) Estructura familiar

Debido a la retención de gametos y crías por parte de la hembra, baja sobrevivencia del esperma en el agua y poca vagilidad de los individuos, debería existir una estructura familiar a pequeña escala.

Se predice que existirá una ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los loci evaluados y una correlación negativa entre distancia genética y coeficiente de parentesco

METODOLOGÍA

1) Área de estudio

Este estudio se realizó en la Isla Ardley en la Bahía Fildes ($62^{\circ} 12' 50,5 \text{ S}$; $58^{\circ} 55' 58 \text{ W}$), ubicada en la península de su mismo nombre ubicada en la parte suroeste de la Isla Rey Jorge en las Islas Shetland del Sur.



Fig. II-1.- Punto de muestreo en Península Ardley frente a Bahía Fildes, Isla Rey Jorge

2) Recolección de muestras en terreno.-

El muestreo de *Abatus agassizii* se realizó mediante buceo en la Isla Ardley en la Bahía Fildes (62° 12' 50.5 S; 58° 55' 58 W) durante la campaña de terreno del año 2008, bajo el marco del Proyecto ECOS – Conicyt/2008.

Asimismo, para revisar dos cohortes distintas de una misma madre, se muestrearon hembras durante la campaña 2011, los cuales fueron recolectadas al azar en el mismo sitio de estudio. Esta expedición fue realizada bajo el Proyecto de Apoyo de Tesis de Postgrado en temáticas antárticas INACH M_02-10.

El muestreo efectuado durante la campaña del 2008, se realizó a lo largo de un transecto de 20m de largo, entre una profundidad de 7.9 y 9.8 m. Se muestrearon 19 cuadrantes de 70x70cm² (Fig. II-2) cada uno con celdas de 10 cm² dispuestos perpendicular a lo largo de la línea del transecto. El cuadrante fue colocado en el sustrato para luego coleccionar todos los individuos, los cuales fueron registrados con su posición dentro del cuadrante (celda) (Fig. II-3)

Posteriormente, las muestras fueron fijadas con alcohol 95% en frascos debidamente sellados y rotulados con el número de identificación, fecha de colecta, acompañado por un documento que identifica la posición de cada espécimen en el cuadrante respectivo. Las muestras fueron trasladadas al

Laboratorio de Ecología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para su posterior análisis genético.

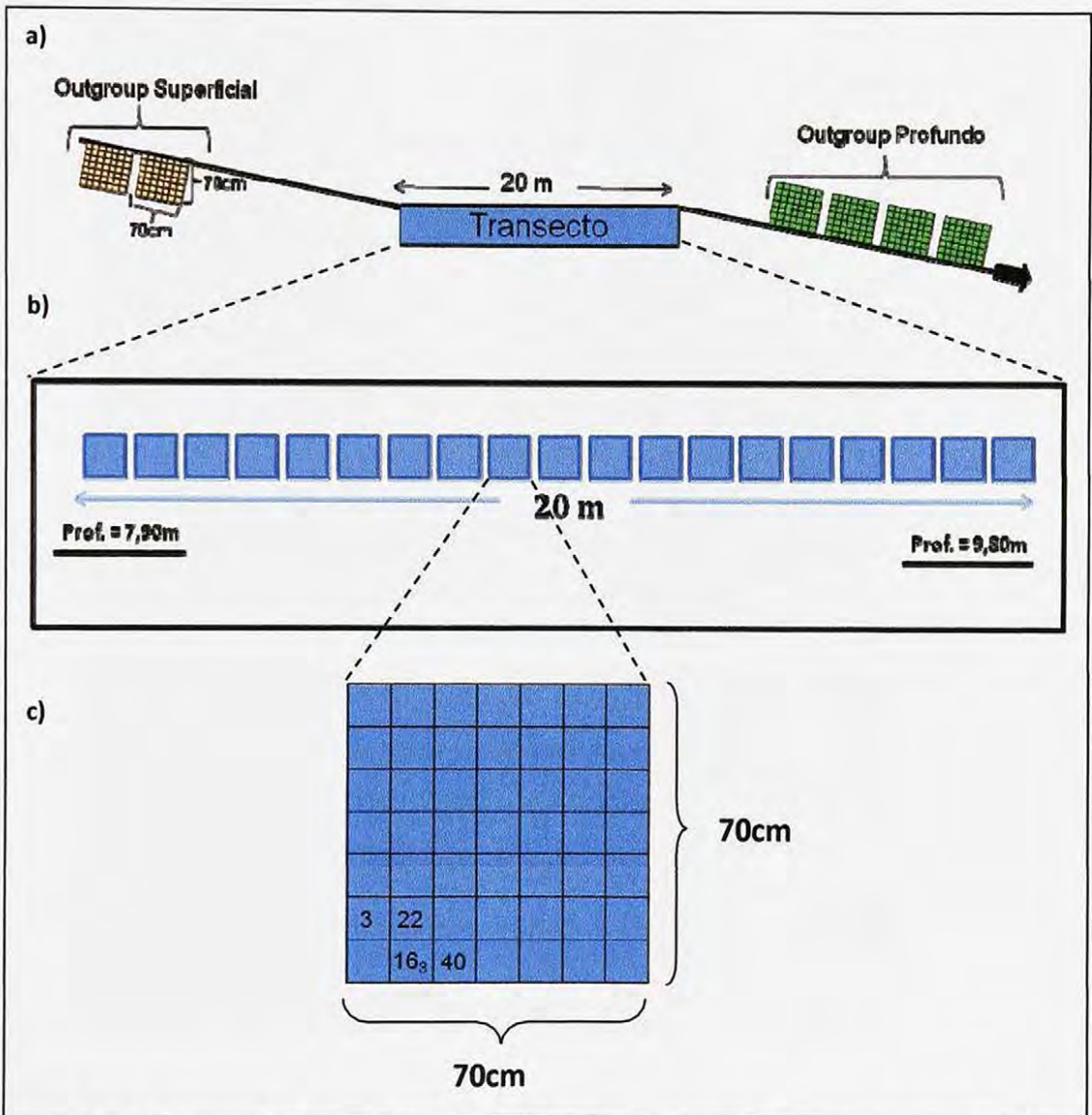


Fig. II-2.- (a) Esquema de la metodología utilizada para realizar el muestreo en terreno (b) esquema del transecto utilizado y las profundidades registradas en sus extremos (c) esquema de cuadrante y sus dimensiones con ejemplos de algunos individuos encontrados.



Fig. II-3.- Fotografías submarinas del muestreo. Arriba: cuadrante dispuesto en el sustrato con cordel de medición. Abajo Derecha: cuadrante con individuos de *A. agassizii* en una de sus celdas. Abajo Izquierda: extracción de un individuo dentro del cuadrante.

3) Densidad y distribución poblacional

Para estimar la densidad de cada escenario se calculó el número de individuos por área en cada cuadrante, utilizando sólo los individuos adultos. Se determinó si ambos escenarios eran significativamente diferente entre sí, mediante un test de permutación (N=10000) en Rndom Project v1.1 (Jadwiszczak 2003).

Se estimó el tipo de distribución (aleatorio, regular o agregada) de los individuos en cada cuadrante, a través de la varianza. Esto también se realizó por escenario, utilizando el promedio de sus cuadrantes ($\bar{X}_{escenario/m^2}$).

4) Sexaje de los individuos colectados e identificación de los estadios incubados.

Los individuos adultos de *A. agassizii* fueron identificados según sexo, basándose en la presencia de cuatro bolsillos dorsales (marsupios) desarrollados sólo en hembras, carácter de dimorfismo sexual asociado a la incubación (Schatt 1996).

Los diferentes estadios incubados fueron removidos de los cuatro bolsillos dorsales de cada madre. La identificación de los estadios se realizaron por simple inspección bajo lupa siguiendo como referencia la clasificación de Schatt & Féral

(1996). Para los erizos recolectados durante la campaña del 2008, la identificación se realizó en Santiago con muestras fijadas en alcohol. Los individuos adultos y sus correspondientes crías fueron aislados para su posterior extracción. En contraste, durante la campaña del 2011, la identificación de adultos y crías se realizó con muestras frescas en el Laboratorio de Bio-recursos Proyecto Corfo InnovaChile a cargo de la Dra. Jeny Blamey ubicado en la Base Científica Prof. Julio Escudero.

5) Extracción y cuantificación de ADN

Todas las muestras – tanto de adultos como de crías – fueron tratadas siguiendo el protocolo de Sales (Aljanabi & Martínez 1997). El tejido utilizado para los individuos adultos fueron espinas y palpos de la zona oral y para las crías se utilizaron los individuos completos.

Posterior a la extracción, se realizaron mediciones de la calidad y cantidad de ADN en cada muestra utilizando un espectrofotómetro de absorbancia de nano-volúmenes de amplio rango de concentraciones (NanoDrop®, Thermo Scientific).

Para las muestras trabajadas en fresco, se utilizó el mismo procedimiento de sales con algunas modificaciones en los tiempos de centrifugación y precipitación.

6) Desarrollo de Microsatélites

Los marcadores moleculares utilizados fueron diseñados por un servicio externo que elaboró un set de microsatélites a partir de ADN concentrados y de buena calidad de *A. agassizii* colectados previamente en el mismo sitio de estudio.

Se evaluó el nivel de polimorfismo de estos microsatélites en individuos adultos de muestras colectadas durante expediciones anteriores. Los loci que resultaron ser más polimórficos y con mejor amplificación fueron seleccionados, y sus respectivos partidores marcados con fluoróforos universales del tipo VIC, NED, FAM, PET – los cuales han sido utilizados en numerosos estudios basados en microsatélites (El-Kassaby *et al.* 2001, Farias 2006, Edwards 2008).

7) Amplificación de Microsatélites

Tras el marcaje se realizaron una serie de estandarizaciones para la amplificación mediante técnica de PCR. Se utilizaron diferentes estrategias de amplificación para cada uno de los 6 loci escogidos (Apéndice 1)

La amplificación fue constatada a través de geles de agarosa al 2% y aquellos que resultaron exitosos fueron enviados a electroforesis capilar en el Centro de Biotecnología Roy J. Carver en la Universidad de Illinois (Urbana-USA). Los tamaños alélicos de cada locus utilizado se visualizarán con el programa Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystem).

Debido al escaso ADN extraído del estadio E1 (gástrulas + blástulas) durante la campaña del 2011, se privilegiaron a los loci más polimórficos (mayor número de alelos). Esto permitió realizar dos ensayos por locus. Además, no hubo constatación de amplificación a través de geles de agarosa, debido a que en numerosas ocasiones los amplicones no fueron detectados por electroforesis, sin embargo si presentaban señal en los electroferogramas.

8) Evaluación de la diversidad genética en la población de *A. agassizii*.

Se evaluó la diversidad genética utilizando un total de 66 individuos adultos (machos y hembras) de *A. agassizii* así como las frecuencias alélicas poblacionales de los nueve loci escogidos. Todos los datos fueron revisados utilizando MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004) para detectar posibles errores de inconsistencia, de lectura así como la presencia de alelos nulos. A partir de los genotipos obtenidos para cada individuo y para cada

locus, se estimó con los programas GENETIX 4.05 (Belkhir et al 1996) y CERVUS (Marshall et al 1998, Slate et al. 2000): el número promedio de alelos por locus (N_A), el contenido de información polimórfica (PIC), la heterocigocidad promedio observada (H_o) y esperada (H_e), y la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus a través del índice F_{is} (Weir & Cockerham 1984).

9) **Análisis de Parentesco entre adultos y correlación espacial**

El parentesco entre pares de individuos se determinó utilizando el total de los adultos genotipados (machos y hembras) y se calculó el coeficiente de parentesco (r) utilizando el estimador de Konovalov & Heg (2008) a través del software Kingroup v2 (Konovalov *et al.* 2004). Las frecuencias alélicas de la población fueron consideradas en cada análisis.

La Probabilidad de Identidad (PI), la cual representa la probabilidad que dos individuos escogidos al azar tengan genotipos idénticos. PI fue calculada para la combinación creciente de los 6 loci. La estimación de PI asume un sistema de apareamiento aleatorio en la cual los individuos no están emparentados. Sin embargo en los análisis se incluyó otro algoritmo (PI emparentados), en la cual estima la probabilidad de identidad en presencia de

individuos emparentados. Se utilizó un coeficiente de parentesco (r) no sesgado, lo cual produce valores negativos de la probabilidad de IBD (Identity By Descent). Los valores negativos de r implican que dos individuos compartirían menos alelos de lo esperado por las frecuencias de Hardy-Weinberg (Queller & Goodnight 1989) *i.e* menos alelos idénticos por descendencia que lo esperado.

Para evaluar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, se realizó un test de permutación locus por locus, usando Genetix (Balkhir et al. 1996). La posible presencia de estructura familiar o “kinship” se evaluó con una correlación entre la distancia (en centímetros) calculada individualmente para cada uno y su coeficiente de parentesco (r) utilizando el estimador de Konovalov & Heg (2008) a través del software Genalex 6 (Peakall & Smouse 2006). Este análisis también se realizó utilizando los valores de parentesco y distancia promedio intra e inter-cuadrante.

10) **Análisis de Patrón de Apareamiento & Nivel de Multipaternidad**

El patrón de apareamiento se estimó basándose en el número mínimo de padres que contribuyen a la diversidad genética observada en un pool de crías provenientes de una misma madre (*i.e* nivel de Multipaternidad) (Johnson & Yund 2007).

Del total de madres genotipificadas, ocho fueron seleccionadas según la densidad de individuos en el transecto. Cinco de ellas fueron escogidas por su ubicación en un sector de baja densidad (Escenario 1) y tres en un sector de alta densidad (Escenario 2). Los machos en el sector agregado fueron escogidos al azar, sin embargo en el sector aislado se escogió el total de machos encontrados.

Se consideró el total de juveniles tardíos (E4) por madre seleccionada, los cuales fueron genotipados y comparados con los genotipos maternos obtenidos. Se evaluaron posibles incompatibilidades entre genotipos maternos y genotipos de la descendencia, asumiendo que ambos deben compartir un alelo por cada locus evaluado. Este análisis fue realizado en GERUD v2.0 (Jones 2001, 2005) el cual reconstruye –conociendo el genotipo materno y el de los juveniles – los posibles genotipos paternos que estarían contribuyendo al pool genético de una misma camada y los posiciona según su valor de likelihood (Jones *et al.* 2009).

11) Asignación de Paternidad

Para medir la capacidad de cierto marcador para identificar paternidad y excluir todos los otros candidatos, se estimó la exclusión de paternidad, medido a través del índice PE. Debido a que la maternidad de esta especie está

establecida, se escogió la probabilidad PE2 (*i.e* Probabilidad de Exclusión cuando se conoce solo un padre para cada locus). Con este índice se determinará si el número de loci utilizados, es suficiente para realizar análisis de parentesco con nuestro set de datos.

Debido a la baja dispersión y poco desplazamiento descrito para el género (Poulin & Féral 1996), se evaluó si la progenie de una misma madre tiene padres candidatos dentro de los machos muestreados y genotipados. Para esto se realizó un análisis de exclusión y asignación de paternidad (Jones 2005) utilizando el software CERVUS (Marshall *et al.* 1998, Slate *et al.* 2000). El cual se basa en la verosimilitud para determinar - a través de una simulación - el nivel de confianza de la asignación de parentesco para cada descendencia.

Se utilizó el parámetro de mostrar a los machos candidatos más verosímiles para cada camada con su respectivo valor de LOD.

12) Eventos de Fecundación

Para los análisis de la submuestra del año 2011, se consideraron cuatro hembras escogidas al azar y en este caso no se muestrearon los machos, ya que se realizó un análisis intracamada donde se compararon los genotipos de cohortes distintas (*i.e* Gástrulas, Juveniles). Se utilizó GERUD v2.0 (Jones 2001,

2005) para testear si distintas cohortes en una misma madre, son originadas por un mismo pool génico paterno (Chenuil 2004).

RESULTADOS

I Análisis de densidad y espacial de la población dentro del transecto

La distribución de los individuos adultos a lo largo del transecto, arrojó dos patrones de densidad distintos, separados por una distancia aproximada de 6 m (Fig. II-4).

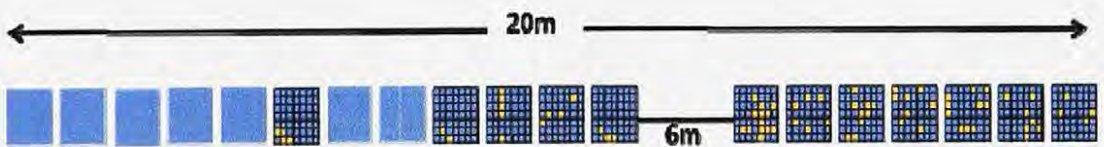


Fig. II-4.- Representación gráfica de la distribución de los individuos a lo largo del transecto de 20m. Las celdas naranja indican presencia de individuos (juveniles, machos y hembras).

Las densidades de cada escenario fueron significativamente diferentes entre sí ($p= 9.999e-5$), con un promedio de adultos de 1.6 por cuadrante en un primer caso y 8.6 adultos por cuadrante para el segundo (Fig. II-5).

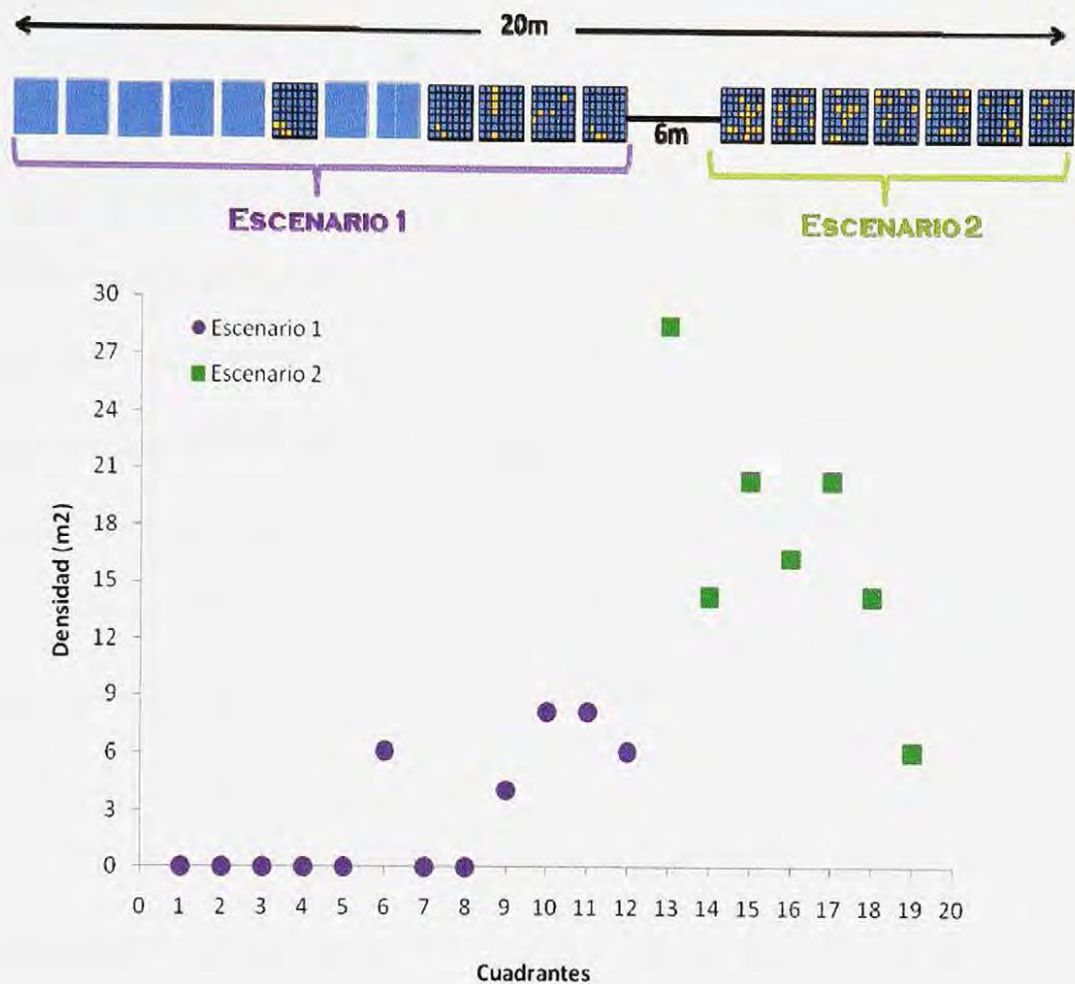


Fig.- II-5.- Distribución de densidad en cada cuadrante dentro del transecto. Se distinguen los dos escenarios con densidades significativamente diferentes.

La distribución de individuos de ambos escenarios fue del tipo regular o uniforme ($S^2 < \bar{X}$). Es decir, los individuos están ubicados a distancias constantes unos de otros.

II.- Análisis moleculares y diversidad genética en *A. agassizii*

a) Extracción y amplificación de ADN

La extracción de ADN de todos los individuos (adultos y crías) fue realizada utilizando el protocolo de sales. Todos los extractos fueron trabajados con una concentración estándar final de 10ng/μL. El ADN de mejor calidad extraído con material fijado, fue obtenido con el estadio E4, por lo que solo se trabajó con este estadio para las muestras del 2008. El ADN extraído de las gástrulas en fresco tuvo mejor resultado que el extraído con las muestras fijadas. Sin embargo, las concentraciones obtenidas fueron muy bajas, por lo que se utilizó el total del ADN sin dilución.

De los 9 loci evaluados, 6 fueron los que resultaron ser los más polimórficos y de mejor señal (Tabla II-2). Numerosos individuos – principalmente en estadio E1 - no presentaron señal en su electroferograma.

Tabla II-2.- Resumen de los 6 loci más polimórficos utilizados en este estudio. SSR: (Short Sequence Repeat) motivo de repetición; pb: pares de bases.

Locus	Secuencia (5' – 3')	SSR	Tamaño alélico (pb)
ABag41	F:GAGGACAATTGTTCTCAGGA	(TG) ₃₅	250
	R:TACTGGTAGTCGACTGCAAA		
ABag44	F:CCTTTTATCCACAATTCATAATG	(CA) ₂₀	162
	R:CTCAATGCTGAAGCCACTATT		
ABag2t	F:CTACCCACGCATAGATTGCA	(CATA) ₁₇	319
	R:AACGAATGTTGCCCCATAGG		
ABag18t	F:ACCGTGACTTAACCAGTGAA	(CATA) ₂₀	173
	R:CTGTATATATACACAACCTTATAAA		
ABag20t	F:CAAGCGGAATACAAAGACA	(GTAT) ₄ .(GTAT) ₅	166
	R:GCTGCATGTTGCCTTATTTG		
ABag22t	F:TAAGCCCTGCAGCAGCATCA	(TAG) ₅₄	285
	R:CACCCTTTTTTTCGGGTGCA		

b) Evaluación de la Diversidad Genética de la Población.-

Los análisis de la diversidad genética basada en 66 individuos adultos de Isla Rey Jorge, arrojaron un promedio de 13 alelos por locus en la población, con un rango entre 3 y 29 alelos en ABag20t y ABag41, respectivamente. La heterocigocidad observada promedio fue de 0.6229, con un rango entre 0.127 y 0.923 para ABag20t y ABag22t, respectivamente. No se observó desequilibrio de ligamiento entre loci y existió un déficit significativo de heterocigotos y Fis significativos en 3 de los 6 loci estudiados (Tabla II-3). Los resultados obtenidos

por MICRO-CHECKER no mostraron evidencia de pérdida de alelos grandes “large allele dropout” o efecto de stuttering, ya que la distribución de homocigotos fue homogénea a lo largo de las diferentes clases de tamaños alélicos. A nivel poblacional se encontró un déficit significativo de heterocigotos sobre el conjunto de los loci evaluados (Fis 0.124, $p < 0.0001$), evidenciando una desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla II-3).

Tabla II-3.- Resumen de la diversidad genética encontrada en población de *A. agassizii* en Isla Rey Jorge, Islas Shetland. N_A : Número promedio de alelos; PIC: Contenido de información polimórfica; H_o : Heterocigocidad observada; H_e : Heterocigocidad esperada. Fis según Weir & Cockerham (1984); (*) valor de $p < 0.05$, (**) valor de $p < 0.01$, (***) valor de $p < 0.001$.

Locus	N_A	PIC	H_o	H_e	Fis
ABag41	26	0.9152	0.8000	0.9147	0.0459
ABag44	10	0.6496	0.3269	0.8389	0.5427***
ABag2t	5	0.6973	0.5385	0.6979	0.16265**
ABag18t	9	0.7954	0.8413	0.8066	-0.0510
ABag20t	3	0.1385	0.1111	0.1337	0.1456*
ABag22t	24	0.9219	0.8308	0.9424	0.01133
$\bar{X} \pm DS$	13 ± 10.9240	0.6863 ± 0.2862	0.6229 ± 0.3335	0.7039 ± 0.2899	0.124***

III.- Análisis de Parentesco

a) *Correlación espacial entre parentesco y distancia geográfica*

La probabilidad que dos individuos escogidos al azar tengan genotipos idénticos (*i.e* Probabilidad de Identidad (PI)), asumiendo individuos no emparentados para la combinación de los 6 loci, fue de $7.3e-08$; asumiendo presencia de individuos emparentados ($r=0.5$), esta probabilidad fue de $4.9e-03$ (Fig. II-6). Esta probabilidad de identificar a los individuos, va a depender mayormente del número de loci utilizados y su heterocigocidad, que del número de alelos por locus.



Fig. II-6.- Probabilidad de Identidad (PI) para cada locus y la combinación de los 6 loci. "PI Fildes": probabilidad de identidad en población evaluada. "PI emparentados": probabilidad de identidad en la población asumiendo individuos emparentados entre sí.

Los coeficientes de parentesco (r) fueron comparados con la distancia geográfica de cada individuo dentro del transecto (Fig. II-7). Los resultados no muestran una correlación significativa entre la distancia geográfica y el coeficiente de parentesco entre los individuos adultos ($P = 0.21$).

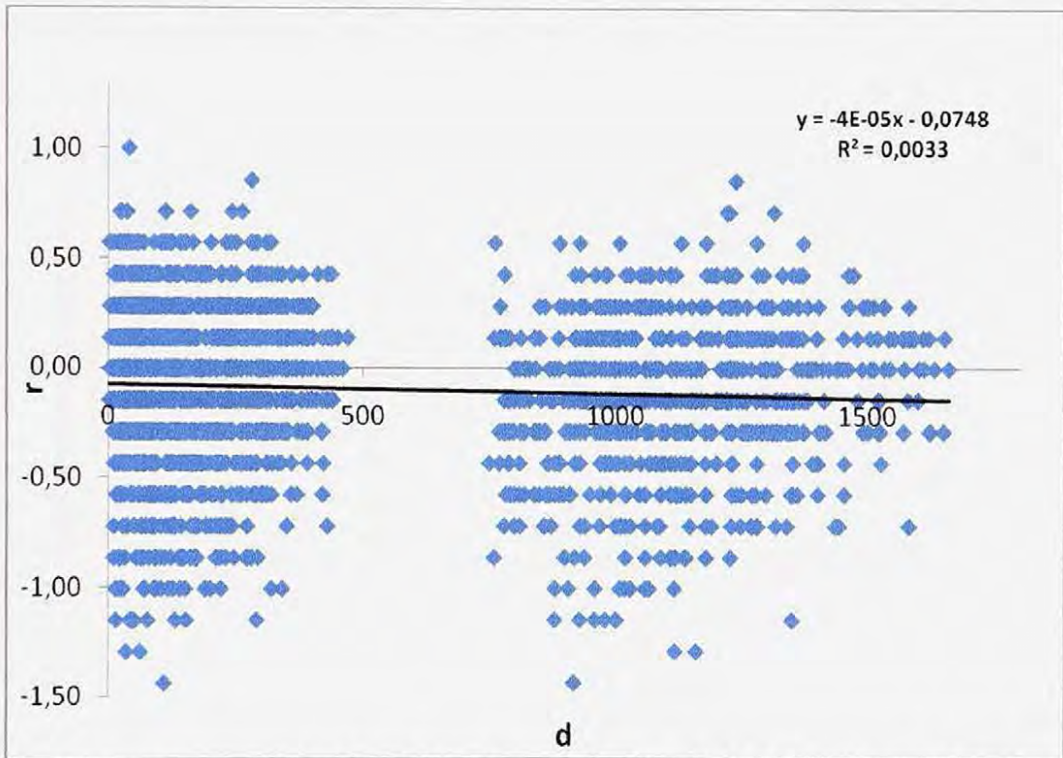


Fig. II-7.- Representación gráfica del test de mantel utilizando la distancia geográfica de los individuos adultos (d) y el coeficiente de parentesco (r).

El coeficiente de parentesco promedio en la población fue de -0.0159 , el que no representó una diferencia significativa de lo esperado por un apareamiento aleatorio ($p=0.11$).

Aún cuando el análisis realizado entre cuadrante disminuyó la dispersión de los datos, no mostró una variación significativa a la tendencia observada utilizando los valores entre individuos (Fig. II-8). Nuevamente, los resultados no muestran una correlación significativa entre la distancia geográfica y el coeficiente de parentesco entre los individuos adultos ($P = 0.20$)

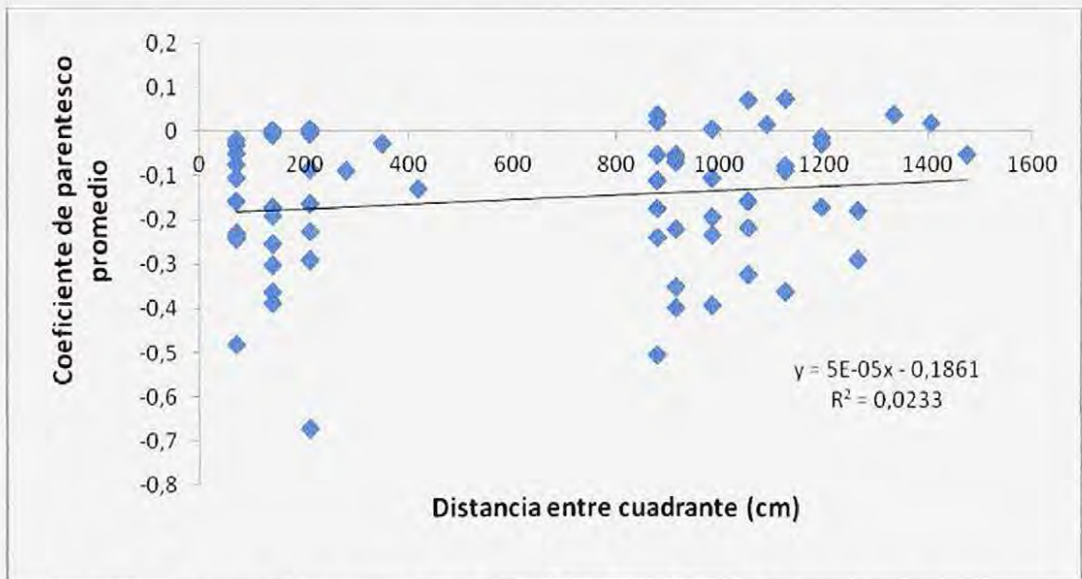


Fig. II-8- .Correlación entre la distancia geográfica y coeficiente de parentesco promedio entre cuadrantes muestreados.

b) Patrón de Apareamiento & Nivel de Multipaternidad en una cohorte

Debido a que el programa GERUDv2.0 no admite ausencia de datos o gaps, se privilegió el número de individuos por sobre el número de loci. Hubo

madres que difirieron en el número de loci evaluados, ya que presentaban mismatch entre el genotipo de la madre - juveniles, además de presencia de gaps. Estos loci fueron eliminados de los análisis.

En el total de las madres analizadas, se encontró un patrón de apareamiento múltiple del tipo poliándrico que varió entre 2 a 5 machos por hembra (Tabla II-4), que tuvo relación con el número de crías analizadas de forma exponencial con un límite superior de 9 machos (Apéndice 2)

Tabla II-4.- Resumen de los principales resultados encontrados en los análisis de multipaternidad realizado a una cohorte (E4) en 8 hembras evaluadas.

Madre	Loci evaluados	Crías evaluadas	Nivel de multipaternidad
M2	5	11	5
M5	4	5	2
M7	4	14	5
M15	4	9	4
M16	5	23	>6
M20	4	9	3
M48	4	11	4
M70	3	5	2

A modo de ejemplificación, la madre 5 (M5), obtuvo un número mínimo de 2 padres para explicar la diversidad genética encontrada en la descendencia. Además se obtuvieron 4 posible genotipos de los padres putativos ordenados

por su valor de likelihood y el número de crías de la camada que estarían explicando (Tabla II-5a)

Tabla II.5a.- Posibles genotipos con el mayor valor de likelihood encontrados para los padres putativos de la camada en la madre 5 (M5). Alelos en cursiva serían los alelos entregados por la madre; alelos en negrita serían los alelos los entregados por el padre.

	Abag22t	Abag20t	Abag18t	Abag2t	Progenie	Likelihood
M5	258/312	144/144	160/168	240/244		
PadreA1	294/327	144/144	156/164	232/236	3	1,06e-18
Juv1	294/312	144/144	156/160	232/244		
Juv2	294/312	144/144	164/168	236/244		
Juv5	312/327	144/144	156/160	232/244		
PadreA2	306/324	144/144	156/160	236/240	2	1,06e-18
Juv4	258/324	144/144	156/160	236/244		
Juv3	306/312	144/144	160/168	240/240		

Tabla II-5b.- Otros posibles genotipos de los padres putativos para la camada de M5 ordenado de forma descendente según su valor de likelihood.

PadreB1	294/324	144/144	156/164	232/236	3	4,02e-19
PadreB2	306/327	144/144	156/160	232/240	2	4,02e-19
PadreC1c	294/327	144/144	156/164	232/236	3	1,733E-19
PadreC2c	306/324	144/144	156/168	236/240	2	1,733E-19
PadreD1	294/324	144/144	156/164	232/236	3	6,569e-20
PadreD2	306/327	144/144	156/168	232/240	2	6,569e-20

Los resultados del nivel de multipaternidad de las hembras evaluadas en el escenario 1 (menos denso) no difirió significativamente de las evaluadas en el escenario 2 (más denso) (Fig. II-9).

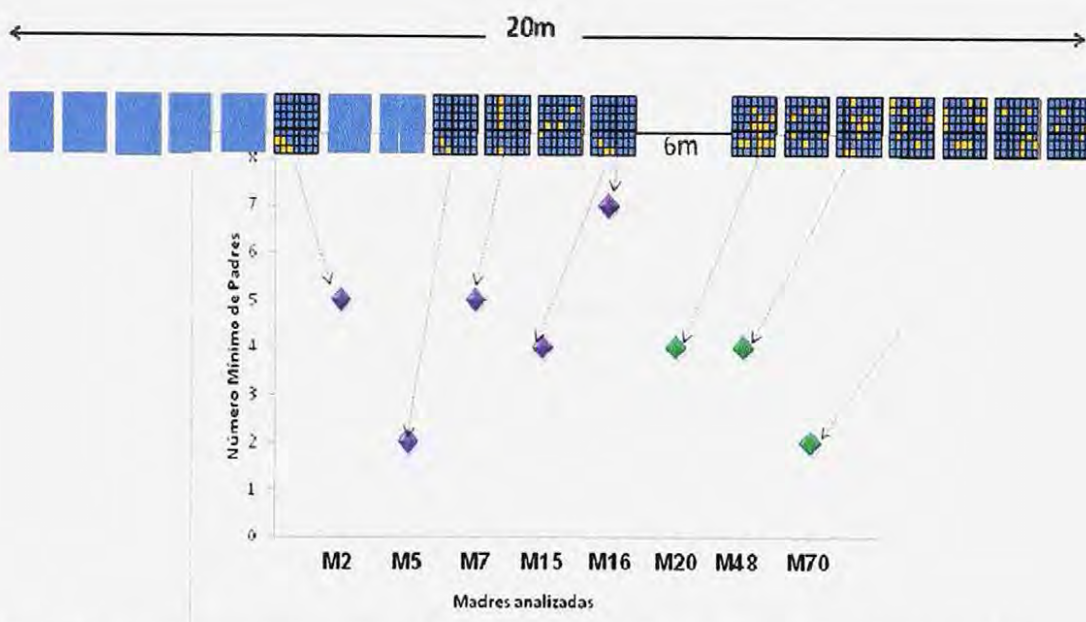


Fig. II-9.- Representación gráfica del número de padres por camada a lo largo del transecto. Eje X: madres evaluadas. Eje Y: Número de machos encontrados por el programa Gerud2

c) Asignación de Paternidad en una cohorte

La estimación de la exclusión de paternidad (PE), nos entrega una medida de la capacidad de cierto marcador para identificar paternidad, excluyendo todos los demás candidatos. La combinación creciente de los 6 loci evaluados, mostró un poder de exclusión bastante alto, lo que da suficiente

poder de exclusión a los análisis de paternidad realizados. La probabilidad de exclusión (PE) graficada, señala la probabilidad mínima y máxima de excluir paternidad cuando esta es falsa conociendo el genotipo de la madre PE mínima para la combinación de los 6 loci, fue de 9.8×10^{-1} y la PE máxima fue de 1.0 (Fig. II-10).

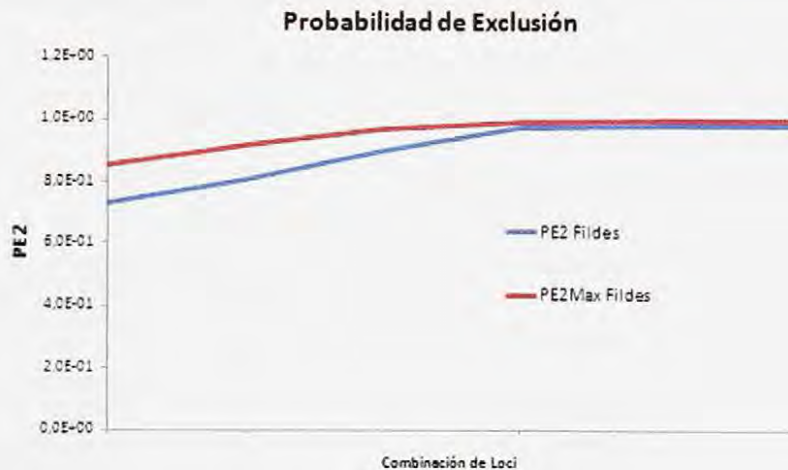


Fig. II-10.- Probabilidad de Exclusión (PE) para cada locus y la combinación creciente de los 6 loci utilizados.

Para los estudios de asignación de paternidad por camada, el programa CERVUS v3.0.3 – a través de los valores de “*log-likelihood ratio*” – arrojó algunos padres candidatos presentes en la genotipificación de los adultos. De estos

candidatos, los machos más probables fueron categorizados por su valor de likelihood y su nivel de confianza (Tabla II-6).

Tabla II-6.- Resumen de los principales resultados obtenidos por el programa CERVUS v3.0.3 para los análisis de asignación de paternidad. ID: Identidad de las crías; PNE: Probabilidad de No-Excluir a un padre candidato no emparentado conociendo a la madre; LOD: El valor de la razón del logaritmo de verosimilitud (log likelihood ratio) entre el padre candidato y la cría (dúo) y entre la madre, padre candidato y la cría (trío); -: sin asignación; (+): 80% de confianza; *: 95% de confianza:

ID crías	PNE	Distancia al padre candidato (cm)	Loci evaluados	Dúo LOD	Trío LOD	Trío Confianza
M2J4	8,63E+11	1226.05	3	1,21E+14	1,88E+14	+
M5J2	4,76E+12	1240.64	3	2,23E+14	2,95E+14	+
M7J11	1,73E+11	1010.8	3	2,22E+14	2,90E+14	+
M7J12	3,85E+11	60	3	3,26E+14	5,32E+14	*
M16J19	1,29E+12	1050.05	5	3,03E+14	4,44E+14	*
M20J6	2,48E+11	92.8	4	4,73E+14	6,52E+14	*
M15J6	2,81E+12	771.62	4	3,03E+14	2,52E+14	-
M15J8	1,54E+12	980.6	4	3,15E+14	3,85E+14	-
M48J9	5,05E+12	130.38	4	2,19E+14	3,30E+14	-
M48J13	1,26E+13	270.77	3	2,52E+14	2,51E+14	-
M48J15	4,38E+11	210.0	4	3,20E+14	1,14E+13	-
M70J2	1,28E+13	110.0	4	2,81E+14	2,93E+14	-

Los padres candidatos presentados por camada y su respectiva madre, no registraron relación con su cercanía. Es decir los machos más cercanos a una hembra no necesariamente son los machos más potenciales para su fecundación.

d) Nivel de Multipaternidad en dos cohortes

En general, para explicar la diversidad encontrada en las dos cohortes evaluadas, se encontró un número promedio de 4 padres como mínimo (Tabla II-7).

Tabla II-7.- Resumen de los principales resultados encontrados en los análisis de multipaternidad realizado a dos cohortes distintas en 4 hembras muestreadas durante la campaña 2011.

Madre	Loci evaluados	Crías evaluadas	Nivel de multipaternidad	Valor de Likelihood
BT33	3	6	2	3,781E-7
BT36	3	8	> 6	¿?
BT52	3	9	4	3,093E-13
BT60	2	8	3	2,502E-15

Debido a que el programa GERUDv2.0 no admite ausencia de datos o gaps, se privilegió el número de individuos por sobre el número de loci y

aquellos loci que arrojaron tamaños alélicos para ambas cohortes. Hubo casos en que solo se evaluaron 2 loci, ya que hubo pocos individuos E1 genotipados.

Para todas las madres escogidas se escogieron los loci con mayor número de datos y eliminaron aquellos individuos que presentaban gaps o incongruencia en los genotipos madre/cría. Para la madre BT36, con un total de 8 crías (3E1+5E4), se encontró un alto número mínimo de padres (> de 6 padres). Los parámetros del programa solo permite un máximo de 6 padres por camada, por lo que este análisis no arrojó los posibles genotipos paternos ni el número de crías que explicaría cada uno. Para la madre BT52, con un total de 9 crías (7E1+2E4), se encontró un número mínimo de 4 padres por camada. Finalmente para la madre BT60, con un total de 8 crías (5E1+3E4), se encontró un número mínimo de 3 padres por camada.

A modo de ejemplificación, en la madre BT33, se escogieron 3 loci por presencia de muchos gaps (Tabla II-8). Con un total de 6 crías (4E1+2E4), se encontró un número mínimo de 2 padres con 12 combinaciones de posibles genotipos. Los 2 genotipos paternos que presentaron un mayor valor de likelihood no necesariamente explican cohortes distintas (*i.e* un padre para E1 distinto del padre para E4).

Tabla II-8.- Genotipos encontrados en la madre BT33 y su correspondiente camada con dos cohortes (G: E1; J: E4). *: posible presencia de alelo nulo; **: incongruencia. Los individuos en **negrita y cursiva** son aquellos que fueron incluidos en el análisis.

Madre	Abag22t	Abag18t	Abag2t	Abag44	Abag41
BT33	264/339	168/172	236/236	156/156	250/326
G1	239/330**	172/180	236/236	—	266/326
G2	—	160/168	—	—	264/326
G3	264/339	—	—	156/156	250/326
G4	264/264	—	—	—	250/326
G6	264/291	—	240/240*	158/158*	250/286
G8	264/315	168/172	236/236	—	250/264
G9	339/339	—	236/236	—	290/326
G10	264/315		236/236		290/326
<i>J1</i>	339/354		236/236	156/156	260/326
J2	264/264		240/244**		250/268
J3	315/339		240/244**		326/326
<i>J4</i>	264/303		236/236	156/166	262/326
J6	264/264		240/240*	158/166	262/326
J7	258/264			156/156	

DISCUSIÓN

En *Abatus agassizii*, se requieren – en promedio - 4 genotipos paternos para explicar la diversidad genética de una cohorte de juveniles en la camada de una hembra. Cabe señalar que el número mínimo de padres aumentó con el número de crías analizadas, por lo que estos resultados podrían subestimar esta cantidad. A pesar de esto, los niveles de multipaternidad encontrados en este trabajo (2-6 machos), están en el rango de algunos invertebrados marinos sésiles (Avisé *et al.* 2011), como el caso del coral *Acropora palifera* (Ayre & Miller, 2006), el cual arrojó un nivel entre 2 a 3 machos; el caso de las ascidias *Diplosoma listernanium* y *Botryllus schlosseri* y briozoos coloniales *Celleporella hialina* (Yund & McCartney 1994, Bishop *et al.* 2000, Pemberton *et al.* 2003) el cual arrojó un nivel de 4 a 7 machos. Y organismos no sésiles, como el caso del gastrópodos *Littorina saxatilis* (Mäkinen *et al.* 2007), *Crepidula coquimbensis* (Brante *et al.* 2011) y *Busycon carica* (Walker *et al.* 2007), cuyos niveles de multipaternidad arrojó ser

uno de los más altos encontrado en invertebrados marinos con un rango entre 3 a 8 machos; también se han reportado multipaternidad en cefalópodos (*Loligo bleekeri* y *Graneledone boreopacifica*), con un rango entre 2 a 3 machos por camada (Iwata *et al.* 2005, Voight & Feldheim 2009). Estos niveles de multipaternidad no tendrían relación con la biología ni con la ecología (*i.e* modo de desarrollo, número de crías por camada, baja o alta movilidad) de las especies (Avisé *et al.* 2011).

Se observó la participación de varios machos en la fecundación de cada camada de las hembras de *A. agassizii*, como es lo esperado para especies en las cuales el macho no participa de cuidados parentales. Según la teoría, la multipaternidad permitiría a las hembras maximizar la diversidad genética de sus crías, aumentando la posibilidad de generar "buenos" genotipos (Jennions & Petrie 2000)

En la mayoría de los trabajos descritos, se ha planteado también la multipaternidad como una respuesta a eludir la endogamia (Mäkinen 2007) y a la limitación de la cantidad de espermatozoides disponible (Levitan 1991, Yund & McCartney 1994, Yund 1995, 1998). En general, *Abatus* presenta características que aumentarían el riesgo de endogamia en la población, ya que como otras especies con desarrollo directo, no presenta una larva pelágica que pueda

dispersar largas distancias y las hembras retienen sus gametos y sus crías. Presentan poca movilidad, viven enterrados en el sustrato y viven habitualmente en poblaciones de alta densidad y con alta agregación, lo cual podría limitar aún más el movimiento entre ellos. En este sentido, la presencia de un sistema de apareamiento múltiple sería una de las estrategias desarrolladas para eludir altos niveles de endogamia y sus efectos deletéreos.

Con respecto a las limitaciones de esperma, se ha documentado que las especies del tipo "spermcast" pueden reunir suficiente esperma para evitar las limitaciones de su escasez en los ambientes marinos, traduciéndose en altas tasas de fecundación con bajas concentraciones espermáticas (Pemberton *et al.* 2003; Fig. II-11). Esto indicaría que las especies del tipo spermcast, tendrían mayor éxito en fecundar bajo un escenario de baja densidad de individuos o escasez de espermio que las especies del tipo broadcaster.

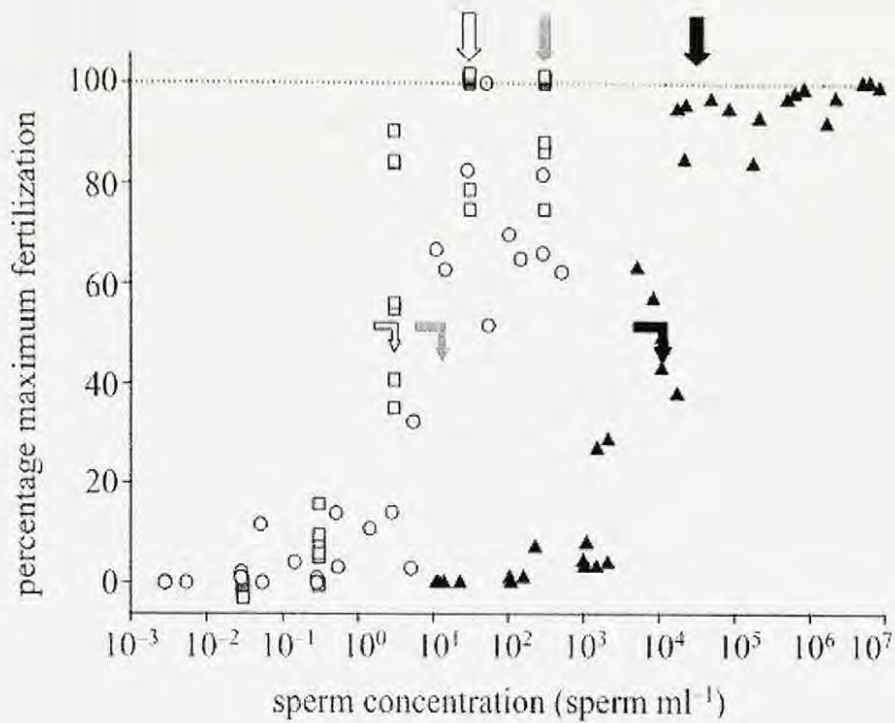


Fig. II-11.- Porcentaje de fertilización a varias concentraciones limitantes de esperma en organismos del tipo "broadcaster" (triángulos; *Strongylocentrotus purpuratus*, Levitan 1993), y del tipo "spermcaster" (cuadrados: briozoo; círculos: ascidia colonial. Flecha recta: indica la concentración a la cual la esperma se vuelve limitante. Flecha curva: indica la concentración del 50% de fertilización máxima. (negras: erizo; blancas: briozoo, gris: ascidia. (Imagen tomada de Pemberton *et al.* 2003, pág 224)

Esto último sería concordante con lo observado con nuestros resultados de la comparación de escenarios con niveles de densidad contrastantes (*i.e* Escenario1: Baja densidad; Escenario2: Alta densidad), los cuales no mostraron diferencias en los niveles de multipaternidad. Hembras en el primer escenario

presentaron el mismo número mínimo de machos que las hembras del segundo escenario, indicando que el sistema de reproducción y patrón de apareamiento es independiente de la densidad.

Aún cuando este estudio no incluyó ningún análisis con respecto a la estructuración de *A. agassizii*, se evaluaron posibles estructuras familiares a pequeña escala. Se encontró que los padres más probables no aparecen en la proximidad de la madre portadora, es decir, los machos lejanos tienen igual probabilidad de llegar a fecundar una hembra que los machos más cercanos. Cabe señalar, que los análisis de parentesco se realizaron en juveniles tardíos, es decir alrededor de 8 a 9 meses tras el evento de fecundación, por lo que las distancias también fueron calculadas tras este tiempo. Este alcance implica que los individuos adultos pudieron haberse desplazado bastante durante el tiempo transcurrido, tanto que también es posible que los machos responsables de la fecundación no hayan sido muestreados, a pesar del gran esfuerzo de muestreo realizado con los cuadrantes. Este desplazamiento podría estar relacionado directamente al modo de alimentación depositívora de esta especie, como de los Schizasteridae en general. Estos organismos deben desplazarse para generar la entrada de sedimento al peristomio - cuya forma se asemeja a una pala (Fig II-12) – desde allí extraen la materia orgánica depositada en dicho sedimento.

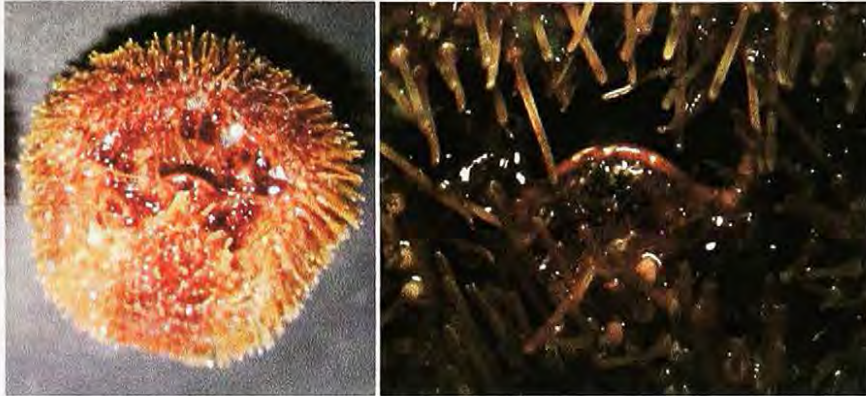


Fig. II-12.- Fotografías de la morfología ventral de *A. agassizii*, se observa la estructura de la boca.

Esta movilidad dentro de la población se vería reflejada en la relación de los coeficientes de parentesco (r) y la distancia (Test de Mantel, $p=0.21$), indicando que los individuos más cercanos, no necesariamente se encuentran más emparentados que aquellos individuos más lejanos. Como consecuencia, habría una ausencia de sub-estructuración genética (nivel de transecto) y endogamia. Con respecto a esto último, el promedio de los coeficientes de parentesco (r) entre individuos adultos no fue significativamente diferente a lo esperado por un sistema de apareamiento dado por el azar (Belkhir *et al.* 2002). En este sentido, al graficar la frecuencia y los valores de coeficiente de parentesco, observamos que la media de los valores de (r) está centrada en 0, es decir, existe una frecuencia de individuos emparentados ($r>0$) similar al de individuos no emparentados ($r\leq 0$) (Fig. II-13)

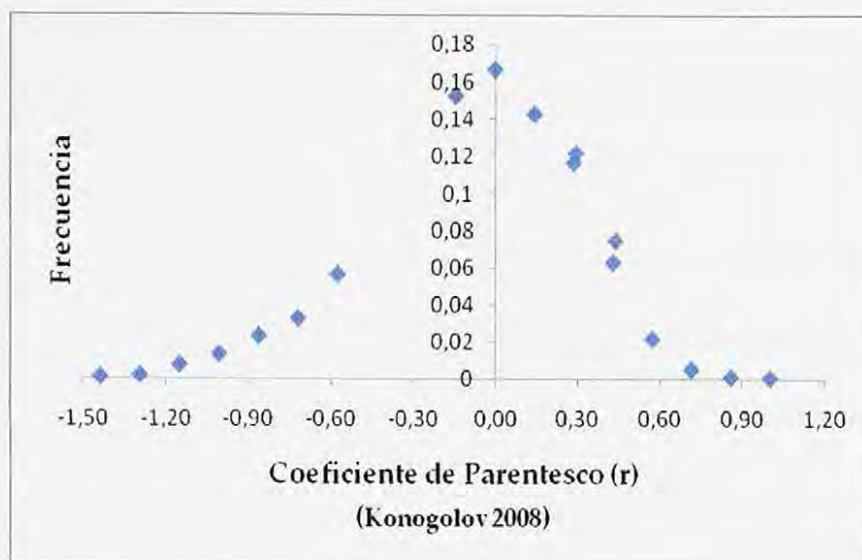


Fig. II-13.- Gráfica de los coeficientes de parentesco entre adultos de la población de *A. agassizii* en Bahía Fildes.

Una explicación alternativa a una cierta homogeneidad genética dentro de la población, podría ser ligada al comportamiento de los juveniles tardíos luego de la liberación de los bolsillos maternos. Estos juveniles tienen un tamaño aproximado entre 4-5mm, por lo podrían ser desplazado por corrientes de marea u oleajes.

Con respecto a la evaluación de la diversidad genética, nuestro estudio revela una heterocigosidad promedio de 0.623. Si evaluamos los niveles de diversidad genética observada en esta población por locus, encontramos que estuvieron dentro de los rangos encontrados en otros estudios realizados con otros miembros de la clase Spatangoidea (*Echinocardium cordatum*, Féral *et al.*

1995; *Abatus cordatus*, Ledoux *et al.* 2011) y en términos más amplios en echinoidea (Carlon & Lippé 2007 en *Tripneustes gratilla*, Calderón *et al.* 2009 en *Paracentrotus lividus*) y en equinodermata (Zulliger *et al.* 2008 en *Astropecten aranciatus*)

Se encontró un déficit significativo de heterocigotos en la población ($Fis=0.124$, $p<0.001$), lo que representaría una desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg. Este déficit de heterocigotos se detectó en 5 de los 6 loci analizados, aunque fue significativo para 3 de ellos. Estos resultados pueden ser la consecuencia de factores biológicos y/o técnicos.

Con respecto a las posibles causas biológicas, el efecto Wahlund (David *et al.* 1997, Whitaker 2003, Dupont *et al.* 2007, 2009 (*i.e.* presencia de microestructuración en una población) podría ser una explicación posible al déficit en heterocigotos debido a la baja dispersión reportada previamente para *A. cordatus* (Poulin & Féral 1994, Ledoux *et al.* 2011). Otra causa biológica sería la presencia de endogamia (*i.e.* apareamiento entre individuos emparentados), ya que las características del sistema de reproducción en esta especie, como es la retención de gametos femeninos, incubación de crías en bolsillos dorsales, baja dispersión y vagilidad, permite pensar que esta causa tiene mayor sentido biológico para

explicar el déficit de heterocigotos en la población. Sin embargo, no se ve un déficit generalizado en todos los loci como es lo esperado en ambos casos.

Finalmente, una desviación a la panmixia podría deberse principalmente a un problema técnico, como lo es la presencia de alelos nulos. Se ha reportado previamente un efecto de alelos nulos en el equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de diversidad genética en Echinoidea (*Strongylocentrotus franciscanu*; McCartney *et al.* 2004). Esta causa podría explicar el importante déficit de heterocigotos observado en el locus Abag44 y su alta significancia (Fis 0.5427, $p < 0.001$), además del elevado número de posibles homocigotos nulos (i.e individuos que no presentan amplificado; Dempster *et al.* 1977). Para verificar esta última explicación, se realizaron PCR locus-específico a las muestras que presentaron posibles alelos nulos, confirmando los mismos resultados.

Considerando que las posibles explicaciones biológicas fundamentadas previamente, no esclarecen satisfactoriamente el fuerte déficit de heterocigotos y que el valor de Fis más grande y significativo fue registrado en un solo locus (i.e Abag 44). Encontramos que la explicación más plausible para explicar la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg se debería principalmente a factores técnicos por presencia de alelo nulo en el Locus Abag44. Alternativamente, este último locus podría estar cercano a una región codificante bajo selección.

CONCLUSIONES FINALES

En las Islas Shetland del Sur, encontramos una población de *Abatus agassizii* cuya estacionalidad reproductiva de carácter anual, señala una similitud con lo encontrado en especies subantárticas. Esta región de la Península Antártica tiene una fuerte variación ambiental, similar – en varios aspectos – a las regiones subantárticas, por lo que los factores exógenos marcarían una influencia en la ciclicidad en los pulsos reproductivos. Alternativamente, esta especie comparte un ancestro común con estas especies subantárticas, lo que podría sugerir una inercia filogenética en el establecimiento del carácter.

En esta población además, encontramos un patrón de apareamiento múltiple de tipo poliándrico, cuyo nivel de multipaternidad está dentro de lo

descrito para invertebrados sésiles y móviles. Este patrón reproductivo sería independiente de la densidad poblacional, así como de la cercanía de los machos a las hembras.

Esta tesis describe la importancia de las variaciones ambientales en el establecimiento de la estacionalidad reproductiva anual de esta especie antártica, así como propone un posible escenario de recolonización postglacial, cuya permanencia se debería a condiciones antárticas similares a las regiones subantárticas.

A su vez, este estudio contribuye con evidencia molecular empírica para conocer más acerca de las consecuencias microevolutivas de la incubación en el mecanismo de reproducción. Además, pone en evidencia la vagilidad de los individuos adultos, lo cual evitaría la generación de subestructuras y endogamia, con sus subsecuentes consecuencias en la diversidad genética.

Si bien, los resultados esclarecen algunos aspectos del sistema reproductivo de esta especie incubante, quedan algunas preguntas por resolver. Por ejemplo, esclarecer otros posibles escenarios para explicar la existencia de la única población antártica – conocida hasta ahora – de *A. agassizii* en Bahía Fildes. Las posibilidades de un posible relictos en estas regiones durante la

glaciación, sería una alternativa atractiva que debiera ser revisada. Además, sería interesante desarrollar estudios de genética de poblaciones y esclarecer las consecuencias de la incubación en el nivel de estructuración intraespecífica, así como también incluir estudios de posibles cuellos de botella y estimación de tamaño efectivo.

Este trabajo representa un avance significativo en el estudio de algunos aspectos genéticos y biológicos que ayudan a entender las estrategias evolutivas y ecológicas de una especie incubante en el Océano Austral. Asimismo, este estudio incorpora – por primera vez – herramientas de análisis molecular, que permitirán avanzar en el estudio de otras poblaciones de *A. agassizii* e inclusive otras especies del género *Abatus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Addison JA & Hart MW.** 2005. Spawning, copulation and inbreeding coefficients in marine invertebrates. *Biological Letters* 1: 450-453
- Ahn IY, J Surh, YG Park, H Kwon, KS Choi, SH Kang, HJ Choi, KW Kim & H Chung.** 2003. Growth and seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* from King George Island, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 257, 99–110.
- Aljanabi S.M. and I. Martínez.** 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693
- Arnaud PM.** 1974. Contribution la bionomie benthique antarctique et subantarctique. *Téthys* 6:469-653.
- Arnquist G & T Nilsson.** 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* 60: 145–164.
- Atkinson, O.S. and P.O. Yund.** 1996. The effect of variation in population density on male fertilization success in a colonial ascidian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 195:111-123.

- Awise JC, A Tatarenkov & JX Liu. 2011.** Multiple mating and clutch size in invertebrates brooders versus pregnant vertebrates. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 108: 11512-11517.
- Baker JR. 1938.** The evolution of breeding seasons. En "Evolution, Essays on Aspects of Evolutionary Biology". GR De Beer (ed.), pp. 161–177. Clarendon Press, Oxford.
- Barrett SCH & CG Eckert. 1990.** Variation and evolution of mating systems in seed plants. En "Biological approaches and evolutionary trends in plants". Kawano (ed.), London: Academic Press.
- Barrett SCH, LD Harder & AC Worley. 1996.** The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical transactions in royal society of London, series B* 351: 1271-1280.
- Bayne BL & RC Newell. 1983.** Physiological energetics of marine molluscs. En: "The mollusca". Saleuddin ASM y Wilbur KM (eds). Academic Press, London, pp 407–515
- Belkhir K, V Castric, F Bonhomme. 2002.** IDENTIX, a software to test for relatedness using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* 2:611–614
- Belkhir K, P Borsa, L Chikhi, N Raufaste & F Bonhomme. 1996-2004.** GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire

Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Birkhead TR & AP Møller. 1998. Sperm Competition and Sexual Selection. TR. Birkhead y AP. Møller (eds). Academic Press, London.

Bishop JDD. 1996. Female control of paternity in the internally fertilizing compound ascidian *Diplosoma listeruanum*. I. Autoradiographic investigation of sperm movements in the female tract. Proceedings the Royal Society Biological Sciences 263:369-376

Bishop JDD & AJ Pemberton. 2006. The third way: spermcast mating in sessile marine invertebrates. Integrative and Comparative Biology, pp 1-9.

Blomqvist D, B Fessl, H Hoi & S Kleindorfer. 2005. High frequency of extra-pair fertilisations in the moustached warbler, a songbird with a variable breeding system. Behaviour 142:1133–1148

Blouin MS. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. TRENDS in Ecology and Evolution 18:503-511

Boivin Y, D Larrivée & JH Himmelman. 1986. Reproductive cycle of the subarctic brooding asteroid *Leptasterias Polaris*. Marine Biology 92: 329-337

- Boomsma JJ, EJ Fjerdingstad & J Frydenberg. 1999.** Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leaf-cutter ants. *Proceeding Royal Society London. B* 266: 249-254
- Bosh I, KA Beauchamp, ME Steele & JS Pearse. 1987.** Development, metamorphosis, and seasonal abundance of embryos and larvae of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Biological. Bulletin* 173: 126–135
- Bosch I. 1989.** Contrasting modes of reproduction in two Antarctic asteroids in the genus *Porania*, with a description of unusual feeding and non-feeding larval types. *Biological Bulletin* 177:77–82
- Bosch I, Pearse JS. 1990.** Developmental types of shallow-water asteroids of McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Biology* 104:41–4
- Buchanan JB. 1966.** The biology of *Echinocardium cordatum* (Echinodermata: Spatangoidea) from different habitats. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 46: 97-114
- Bowden DA, A Clarke & LS Peck. 2009.** Seasonal variation in the diversity and abundance of pelagic larvae of Antarctic marine invertebrates. *Marine Biology* 156: 2033-2047

- Brante** 2007. Limitaciones intracapsulares en dos especies de gastrópodos con modos de desarrollo contrastantes. Tesis doctoral, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Biología, Santiago, Chile
- Brante A, M Fernández & F Viard.** 2011. Microsatellite evidence for sperm storage and multiple paternity in the marine gastropod *Crepidula coquimbensis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology En Prensa
- Branch GM, CG Attwood, D Gianakouras & ML Branch.** 1993. Patterns in the benthic communities on the shelf of the sub-Antarctic Prince Edward Islands. Polar Biology I 13:23 - 34
- Brazeau DA, DF Gleason & ME Morgan.** 1998. Self-fertilization in brooding hermaphroditic Caribbean corals: Evidence from molecular markers Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 231: 225–238
- Calderon I, X Turon & M Pascual.** 2009. Isolation of nine nuclear microsatellites in the common Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck). Permanent Genetic Resources Note 1145-1147
- Campbell AC, S Coppard, D'Abreo C & R Tudor-Thomas.** 2001. Escape and aggregation responses of three echinoderms to conspecific stimuli. Biological Bulletin Woods Hole 201:175–185

- Carlson DB, RR Olson** 1993. Larval dispersal distance as an explanation for adult spatial pattern in two Caribbean reef corals. *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 73: 247-263
- Carlson DB & C Lippé.** 2007. Eleven microsatellites markers for the tropical sea urchin *Tripneustes gratilla* and cross-amplification in *Tripneustes ventricosa*. *Molecular Ecology Notes* 7:1002-1004
- Chaparro OR & RJ Thompson.** 1998. Physiological energetic of brooding in Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Marine Ecology Progress series* 171: 151-163
- Chenuil A, A Gault & JP Ferál.** 2004. Paternity analysis in the Antarctic brooding sea urchin *Abatus nimrodi*. A pilot study. *Polar Biology* 27: 177-182.
- Chiantore M, M Guidetti, M Cavallero, F De Domenico, G Albertelli, R Cattaneo-Vietti.** 2006. Sea urchins, sea stars and brittle stars from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Polar Biology* 29: 467-475
- Ciesielkin PF. et al.** 1982. The development of Antarctic glaciation and the Neogene paleoenvironment of the Maurice Edwig Bank. *Marine Geology* 46: 1-51
- Clark RB.** 1979. Environmental determination of reproduction in polychaetes. En "Reproductive Ecology of Marine Invertebrates". SE. Stancyk (ed.), pp. 107-121. University of South Carolina Press, Columbia.

- Clarke A. 1982. Temperature and embryonic development in polar marine invertebrates. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 5: 71-82
- Clarke A. 1987. Temperature, latitude and reproductive effort. *Marine Ecology Progress Series* 38: 89-99
- Clarke A. 1988. Seasonality in the antarctic marine environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 90(3): 462-473
- Clarke A. 1991. What Is Cold Adaptation and How Should We Measure It? *American Zoologist* 31(1): 81-92
- Conand C. 1993. Reproductive biology of the holothurians from the major communities of the New Caledonian Lagoon. *Marine Biology* 116: 439-450
- Cutullé C, NN Jonsson & JM Seddon 2009. Multiple paternity in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* confirmed by microsatellite analysis. *Experimental and Applied Acarology* 50(1): 51-58
- David P, MA Perdieu, AF Pernet & P Jarne. 1997. Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution* 51, 1318–1322.
- David A. Bowden. 2005. Seasonality of recruitment in Antarctic sessile marine benthos. *Marine Ecology Progress Series* 297: 101-118

- David B, T Choné, R Mooi & C De Ridder.** 2005. Antarctic Echinoidea. Ronald Fricke (ed.), pp. 180-188, 193-195. ARG Gantner Verlag KG
- Dearborn JH.** 1965. Ecological and faunistic investigations of the marine benthos at McMurdo Sound, Antarctica. PhD thesis, Stanford University
- Dell RK.** 1972. Antarctic Benthos. *Advances in Marine Biology*, 10:1– 216
- Dempster AP, NM Laird & DB. Rubin.** 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 39(1): 1-38.
- Díaz A.** 2008. Origen y evolución de la fauna marina bentónica antártica: diversidad genética y divergencia molecular entre especies congénéricas de Echinoidea de Antártica y Sudamérica. Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Dunbar MJ.** 1968. Ecological development in polar regions. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- El-Kassaby YA, CH Newton & CE Ritland.** 2001. Characterization of microsatellite loci in white pine weevil (*Pissodes strobi*). *Molecular Ecology Notes* 1:248-249.
- Edwards CE, DE Soltis & PS Soltis.** 2008. Isolation, characterization and cross-species amplifications of microsatellite loci from *Conradina* (Lamiaceae). *Molecular Ecology Resources* 8:363-366

- Farias I, L Muniz, S Astolfi-Filho & I Sampaio. 2006.** Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology Resources* 6:660-663
- Fell HB. 1946.** The embryology of the viviparous Ophiuroid *Amphipholis squamata* Delle Chiaje. *Transaction of the Royal Society of New Zealand* 75 (4) 419-464
- Fernandez M, C Bock & H Pörtner. 2000.** The cost of being a caring mother: the ignored factor in the reproduction of marine invertebrates. *Ecology Letters* 3:487-484
- Fossøy F, A Johnsen & JT Lifjeld. 2007.** Multiple genetic benefits of female promiscuity in a socially monogamous Passerine. *Evolution* 62 (1): 145–156
- Gage, J.D., Tyler, P.A., 1991.** *Deep-sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep-sea Floor.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Galley EA, PA Tyler, A Clarke & CR Smith. 2005.** Reproductive biology and biochemical composition of the brooding echinoid *Amphipneustes lorioli* on the Antarctic continental shelf. *Marine Biology* 148: 59-71
- Galley EA, PA. Tyler, CR Smith & A Clarke. 2008.** Reproductive biology of two species of holothurian from the deep-sea order Elasipoda, on the Antarctic continental shelf. *Deep-Sea Research Part II* 55 (22-23): 2515-2526.

- Giese AC. 1959a.** Comparative physiology: annual reproductive Cycles of marine invertebrates. *Annual Review of Physiology* 21: 547-576
- Giese AC. 1959b.** Reproductive cycles of some west coast invertebrates. En "Photoperiodism vand related phenomena in plants and animals", RB. Withrow (ed.), pp. 625-638. American Association for the Advancement of Science, Washington, DC
- Giese AC & JS Pearse. 1974.** Introduction : General principle. En "Reproduction of marine invertebrates". AC Giese y JS Pierce (eds), pp 1-49. Academic Press, New York.
- Giese AC & H Kanatani. 1987.** Maturation and spawning. En "Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. 9". A. C. Giese, J. S. Pearse y V.B. Pearse (eds.), pp. 251-329. Blackwell Scientific Publications and The Boxwood Press, California.
- Giese AC, JS Pierce & V Pierce. 1991.** *Reproduction of Marine Invertebrates Vol. 6 Echinoderm and Lophophorates.* Boxwood Press, Pacific Grove, California, USA.
- Gil DG, HE Zaixo & JA Tolosano. 2009.** Brooding of the sub-Antarctic heart urchin, *Abatus cavernosus* (Spatangoida: Schizasteridae), in southern Patagonia. *Marine Biology* 156: 1647-1657.

- Gillespie JM & JB McClintock.** 2007. Brooding in echinoderms: How can modern experimental techniques add to our historical perspective? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342: 191–201
- Gooch JL.** 1975. Mechanisms of evolution and population genetics. En “Marine Ecology 111”. O. Kinne (ed.), pp 349-409. Wiley London
- Grange LJ, PA Tyler, LS Peck & N Cornelius.** 2004. Long-term interannual cycles of the gametogenic ecology of the Antarctic brittle star *Ophionotus victoriae*. *Marine Ecology Progress Series* 278, 141–155.
- Gray EM.** 1997. Female red-winged blackbirds accrue material benefits from copulating with extra-pair males. *Animal Behavior* 53:625–639.
- Gray SM, LM Dill & JS McKinnon.** 2007. Cuckoldry incites cannibalism: Male fish turn to cannibalism when perceived certainty of paternity decreases. *American Naturalist* 169: 258–263.
- Grobe H & A Mackensen.**1992. Late Quaternary climatic cycles as recorded in sediments from the Antarctic continental margin. *Antarctic Research Series* 56, 49–376
- Hamel, J.-F., and A. Mercier.** 1996. Gamete dispersion and fertilization success of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 8:34–40.

- Hamel JF, A Mercier. 1995. Prespawning behavior, spawning, and development of the brooding starfish *Leptasteris Polaris*. *Biological Bulletin* 188: 32-45
- Hammer Ó, DAT Harper & PD Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4(1): 9
- Harvey EB. 1956. *The American Arbacia and Other Sea Urchins*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, pp 298
- Hernando MP. 2006. Efectos de la radiación solar sobre el Wtoplancton de aguas Antárticas y sub-Antárticas. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina
- Higgs N, A Reed, R Hooke, D Honey, O Heilmayer & S Thatje. 2009. Growth and reproduction in the Antarctic brooding bivalve *Adacnarca nitens* (Philobryidae) from the Ross Sea. *Marine Biology* 156 (5): 1073-1081.
- Hosken DJ & P Stockley. 2003. Benefits of polyandry: a life history perspective. *Evolutionary Biology* 33: 173-194
- Hughes L. 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already. *Trends in Ecology and Evolution* 15 (2) 56-61
- Imbrie J; JD Hays; DG Martinson, A McIntyre, AC Mix, JJ Morley, NG Pisias, WL Prell & NJ Shackleton. 1984. The orbital theory of Pleistocene climate: support

from a revised chronology of the marine ^{18}O record. En: Milankovitch and Climate Berger, A. *et al.* (eds), pp. 269–305, Reidel Publishing, pp 269

Iwata Y, H Munehara & Y Sakurai. 2005. Dependence of paternity rates on alternative reproductive behaviors in the squid *Loligo bleekeri*. Marine Ecology Progress Series 298: 219-228

Jadwiszczak P. 2003. Rndom Projects: an application for randomization and bootstrap testing, version 1.1. Computer program available from the web site <http://pjadw.tripod.com>

Jennions MD & Petrie M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. Biological Reviews 75: 21–64

Johannesson K. 1992. Genetic variability and large scale differentiation in two species of littorinid gastropods with planktotrophic development, *Littorina littorea* (L.) and *Melarhaphe* (*Littorina*) *neritoides* (L.) (Prosobranchia: Littorinacea), with notes on a mass occurrence of *M. neritoides* in Sweden. Biological Journal of the Linnean Society 47: 285–299.

Johnson SL & PO Yund. 2007. Variation in multiple paternity in natural populations of a free-spawning marine invertebrate. Molecular Ecology 16:3253-3262

Johnson SL & PO Yund. 2007. Variation in multiple paternity in natural populations of a free-spawning marine invertebrate. Molecular Ecology 16:3253 - 3262

- Johnston EL & KM Lee. 2008.** Brooding behaviour and reproductive success in two species of free-living simultaneous hermaphrodites. *Marine Biology* 155: 555-561
- Jones AG. 2001.** GERUD 1.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multilocus DNA data. *Molecular Ecology Notes* 1: 215–218.
- Jones AG. 2005.** GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* 5:708-711
- Jones AG, CM Clayton, KA Paczolt & NL Ratterman. 2009.** A practical guide to methods of parentage analysis. Technical Review. *Molecular Ecology Resources* 10: 6-30
- Kamel SJ, FX Oyarzún & RK Grosberg. 2010.** Reproductive Biology, Family Conflict, and Size of Offspring in Marine Invertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 50(4): 619-629
- Kang CK, MS Park, PY Lee, WJ Choi, WC Choi. 2000.** Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *Journal Shellfish Research* 19:771–778

- Kang DH, IY Ahn & KS Choi. 2009.** The annual reproductive pattern of the Antarctic clam *Laternula elliptica* from Marian Cove, King George Island. *Polar Biology* 32: 517-528.
- Konovalov DA, C Manning & MT Henshaw. 2004.** KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* 4, 779-782
- Konovalov DA & D Heg. 2008.** A maximum-likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. *Molecular Ecology Resources* 8, 256-263
- Laloi D, M Richard, L Lecomte, M Massot & J Clobert. 2004.** Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Molecular Ecology* 13: 719-723
- Lawrence JM & J Herrera. 2000.** Stress and deviant reproduction in echinoderms. *Zoological studies* 39 (3): 151-171
- Ledoux JB. 2010.** Conséquences du mode de développement protégé sur la structuration génétique à petites échelles spatiales de l'oursin subantarctique incubant, *Abatus cordatus* (Verrill, 1876), endémique des îles Kerguelen. These doctorale
- Ledoux JB, K Mokhtar-Jamai, C Roby, JP Féral, J Garrabou & D Aurelle. 2010.** Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral [*Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758)]: new insights into evolutionary processes shaping

nuclear diversity and implications for conservation. *Molecular Ecology* 19(4): 675-690

Ledoux JB, K Tarnowska, K Gérard, E Lhuillier, B Jacquemin, JP Féral & A Chenuil.

2011. Fine-scale spatial genetic structure in the brooding sea urchin *Abatus cordatus* suggests vulnerability of the Southern-Ocean marine invertebrates facing global change. En prensa

Levitan DR. 1988. Asynchronous spawning and aggregative behavior in the sea urchin

Diadema antillarum (Philippi). *Echinoderm Biology*; Burke *et al.* (eds), AA. Balkema, Rotterdam.

Levitan DR, MA Sewell & F Chia. 1991. Influence of body size and population density

on fertilization success and reproductive output in a free spawning invertebrate. *The Biological Bulletin* 181:261-268

Levitan DR, MA Sewell & F Chia. 1992. How distribution and abundance influence

fertilization success in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Ecology* 73(1):248-254

Levitan DR & C Petersen. 1995. Sperm limitation in the sea. *Trends in ecology and*

evolution 10:228:231

- Levitan DR.** 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Proceedings Biological Sciences London B. 267:531-534
- Levitan DR.** 2004. Density-dependent sexual selection in external fertilizers: variances in male and female fertilization success along the continuum from sperm limitation to sexual conflict in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. The American naturalist 164(3): 298-309
- Levitan DR.** 2005. Sex-Specific Spawning Behavior and Its Consequences in an External Fertilizer. The American Naturalist 165 (6): 682-694
- Lightfoot RH, Tyler PA & Gage JD.** 1979. Seasonal reproduction in deep sea bivalves and brittlestars. Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers 26: 967-974.
- Lockhart SJ, PM O'Loughlin & P Tutera.** 1994. Brood protection and diversity in echinoids from Prydz Bay, Antarctica. En "Echinoderms through time" B. David, A. Guille, JP. Féral y M Roux (eds), pp. 749-756. Balkema, Rotterdam
- Lynch M & K Ritland.** 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. Genetics 152, 1753-1766
- Magniez P** 1983. Reproductive cycle of the brooding echinoid *Abatus cordatus* (Echinodermata) in Kerguelen (Antarctic Ocean): changes in the organ indices,

biochemical composition and caloric content of the gonads. *Marine Biology* 74: 55-64

Mäkinen T, M Panova & C André. 2007. High levels of multiple paternity in *Littorina saxatilis*: hedging the bets? *Journal of Heredity* 98(7): 705-711

Maldonado M & PR Bergquist. 2002. Phylum Porifera. In Young CM, editor. Atlas of marine invertebrate larvae. San Diego: Academic Press. p 21–50.

Mantel NA. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209–220

Marshall TC, J Slate, LEB Kruuk & JM Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655

Marshall DJ & JP Evans 2005. The benefits of polyandry in the free-spawning polychaete *Galeolaria caespitosa*. *Journal of evolutionary biology* 18: 735-741.

Martel A, DH. Larrivée, KR Klein & JH Himmelman. 1986. Reproductive cycle and seasonal feeding activity of the neogastropod *Buccinum undatum*

McCartney MA, K Brayer & DR Levitan. 2004. Polymorphic microsatellite loci from the red urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, with comments on heterozygote deficit. *Molecular Ecology Notes* 4:226-228.

- McClary DJ & PV Mladenov. 1989. Reproductive pattern in the brooding and broadcasting sea star *Pteraster militaris*. *Marine Biology* 103 (4): 531-540
- McEdward LR. 1997. Reproductive strategies of marine benthic invertebrates revisited: facultative feeding by planktotrophic larvae. *The American Naturalist* 150:48-72
- McEdward LR & DA Janies. 1997. Relationships among development, ecology, and morphology in the evolution of echinoderm larvae and life cycles. *Biological Journal of the Linnean Society* 60:381-400
- McQueen DJ & CGH Steel. 1980. The role of photoperiod and temperature in the initiation of reproduction in the terrestrial isopod *Oniscus asellus* Linnaeus. *Canadian Journal of Zoology*. 58:235-240.
- Menge BA. 1975. Brood or broadcast? The adaptive significance of different reproductive strategies in the two intertidal sea stars *Leptasterias hexactis* and *Pisaster ochraceus*. *Marine Biology* 31: 87-100
- Mileikovsky SA. 1971. Types of larval development in marine bottom invertebrates, their distribution and ecological significance: a re-evaluation. *Marine Biology* 10:193-213
- Miller RL. 1989. Evidence for the presence of sexual pheromones in free-spawning starfish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 130, 205-222.

- Mitchell RJ, Karron JD, KG Holmquist & JM Bell. 2005. Patterns of multiple paternity in fruits of *mimulus ringens* (Phrymaceae). American Journal of Botany 93 (5): 885-890
- Møller AP & R Thornhill. 1998. Male parental care, differential parental investment by females and sexual selection. Animal Behavior 55:1507-1515
- Møller AP. 2000. Male parental care, female reproductive success and extrapair paternity. Behavioral Ecology 11(2): 161-168
- Mortensen T.1951. Spatangoida (11)-Amphisternata (11)-Spatangidae, Loveniidae, Pericosmidae, Schizasteridae, Brissidae . Amonograph of the Echinoidea, Vol. 2. C.A. Reitzels (ed.), Copenhagen, Denmark .
- Muthiga NA & V Jaccarini. 2005. Effects of seasonality and population density on the reproduction of the Indo-Pacific echinoid *Echinometra mathaei* in Kenyan coral reef lagoons. Marine Biology 146 (3): 445-453
- Muthiga NA & J Kawaka. 2008. The effects of temperature and light on the gametogenesis and spawning of four sea urchin and one sea cucumber species on coral reefs in Kenya. Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida

- Myers EM & KR Zamudio. 2004.** Multiple paternity within natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. *Molecular Ecology* 13: 1951-1963
- Newcomer SD, JA. Zeh & DW Zeh. 1999.** Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 96: 10236-10241
- Olive PJW. 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
- Orton JH. 1920.** Sea temperature, breeding and distribution in marine animals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 12: 339-366.
- Orsi AH, T Whitworth & WD Nowlin. 1995.** On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep-Sea Research I* 42: 641-673
- Östergreen H. 1912.** Über die Brutpflege der Echinodermen in den Südpolaren Küstengebieten. *Zeitschrift Wissenschaften Zoologie*, 101:325-341
- Oyarzún C, R. Galleguillos & J Monsalves. 1997.** Variabilidad genética en peces demersales: Distribución en profundidad versus restricciones filogenéticas. *Scientia Marina* 61(3): 291-296

- Oyarzún P, JE Toro, R Jaramillo, R Guíñez, C Briones & M Astorga. 2010. Análisis comparativo del ciclo gametogénico de *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae), en las localidades de Taltal y Huasco, norte de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45 (1): 43-58
- Palma AT, E Poulin, MG Silva, RB San Martín, CA Muñoz & AD Díaz. 2006. Antarctic shallow subtidal echinoderms: is the ecological success of broadcasters related to ice disturbance? *Polar Biology* 30: 343-350
- Paulay G & C Meyer. 2006. Dispersal and divergence across the greatest ocean region: Do larvae matter? *Integrative and Comparative Biology* 46 (3): 269–281
- Pawson DL. 1969. Echinoidea . En "Antarctic map folio series, Folio 11". W.C . Bushnell y JW. Hedgpeth (eds), pp . 38-41 American Geographical Society, New York.
- Peakall R & PE Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Pearse JS. 1969. Slow developing demersal embryos and larvae of the Antarctic Sea star *Odontaster validus*. *Marine Biology*, 3:110-116
- Pearse JS. 1970. Reproductive periodicities of Indo-Pacific Invertebrates in the Gulf of Suez. III. The Echinoid *Diadema Setosum* (Leske). *Bulletin of Marine Science* 20(3): 697-720

- Pearse JS & CW Walker. 1986.** Photoperiodic regulation of gametogenesis in a North Atlantic sea star *Asteria vulgaris*. *Invertebrate Reproduction & Development* 9: 71-78
- Pearse JS, JD Eernisse, VB Pearse & KA Beauchamp. 1986.** Photoperiodic Regulation of Gametogenesis in Sea Stars, with evidence for an Annual Calendar Independent of Fixed Daylength. *American Zoologist* 26: 417-431
- Pearse JS & JB McClintock. 1990.** A comparison of reproduction by the brooding spatangoid echinoids *Abatus shackletoni* and *A. nimrodi* in McMurdo Sound, Antarctica. *Invertebrate Reproduction and Development* 17(3): 181-191
- Pearse JS & RA Cameron. 1991.** Echinodermata: Echinoidea. En: "Reproduction of Marine Invertebrates Vol. VI". (AC Giese, JS Pearse y VB Pearse, eds.), pp. 513-662. Boxwood Press, California, USA.
- Pearse JS, JB McClintock, I Bosch. 1991.** Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempos, modes, and timing. *American Zoologist* 31: 65-80
- Pearse JS. 1994.** Cold-water echinoderm break "Thorson's Rule" En: Young, Reproduction, Larval Biology, and Recruitment of the Deep benthos". C.M, Eckelbarger, K.J (eds.), pp. 26-39, 550-559, 570-573. Columbia Univ. Press, New York, USA

- Pearse JS & I Bosch. 2002.** Photoperiodic regulation of gametogenesis in the Antarctic sea star *Odontaster validus* Koehler: evidence for a circannual rhythm modulated by light. *Invertebrate Reproduction and Development* 41: 73–81
- Pearse JS & SJ Lockhart. 2004.** Reproduction in cold water: paradigm changes in the 20th century and a role for cidaroid sea urchins. *Deep – Sea Research II* 51:1533-1549
- Pearse JS, R Mooi, SJ Lockhart & A Brandt. 2008.** Brooding and species diversity in the Southern Ocean: Selection for brooders or speciation within brooding clades? *Smithsonian at the Poles: contributions to International Polar Year science 2007/2008*. Smithsonian Institution Scholarly Press pp 181-194.
- Pechenik JA. 1999.** On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrates life cycles. *Marine Ecology Progress Series* 177: 269-297
- Peck LS, A Clarke & AL Chapman. 2006a.** Metabolism and development of pelagic larvae of Antarctic gastropods with mixed reproductive strategies. *Marine Ecology Progress Series* 318: 213-220.
- Peck LS, P Convey & DKA Barnes. 2006b.** Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability. *Biological Review* 81: 75-109

- Pennington JT.** 1985. The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biological Bulletin*, 169: 417-430
- Pemberton AJ, RN Hughes, PH Manríquez & JDD Bishop.** 2003. Efficient utilization of very dilute aquatic sperm: sperm competition may be more likely than sperm limitation when eggs are retained. *Proceeding Royal Society London. B* 266: 249-254
- Pérez AF, C Boy, E Morriconi & J Calvo.** 2010. Reproductive cycle and reproductive output of the sea urchin *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) from Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Polar Biology* 33: 271-280.
- Picken LS.** 1980. Reproductive adaptation of Antarctic benthic invertebrates. *Biological Journal of the Linnean Society*. 14: 67-75
- Pierscieniak K, J Grzymala & M Wolowicz.** 2010. Differences in reproduction and condition of *Macoma balthica* and *Mytilus trossulus* in the Gulf of Gdańsk (Southern Baltic Sea) under anthropogenic influences. *International Journal of Oceanography and Hidrobiology* XXXIX (4) 17-32
- Poulin E & JP Féral** 1994. - The fiction and the facts of Antarctic brood protecting: population genetics and evolution of Schizasterid echinoids. En: *Echinoderms*

through time (B. David, A. Guille, JP. Féral & M. Roux eds), p. 837-844. Balkema, Rotterdam .

Poulin E & JP Féral. 1995. Pattern of spatial distribution of a brood-protecting schizasterid echinoid, *Abatus cordatus*, endemic to the Kerguelen Islands. *Marine Ecology Progress Series* 118: 179-186

Poulin E. 1996. Signification adaptative et conséquences évolutives de l'incubation chez un invertébré marin benthique subantarctique, *Abatus cordatus* (Verril, 1876) [Equinodermata: Spatangoidea]. These doctorale, Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, France

Poulin E & JP Féral. 1996. Why are so many species of brooding Antarctic echinoids? *Evolution* 50:820-830

Poulin E, S Boletzky & JP Féral. 2001. Combined ecological factors permit classification of development patterns in benthic marine invertebrates: a discussion note. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257:109-115

Poulin E, A Palma & JP Féral. 2002. Evolutionary versus ecological success in the Antarctic benthic invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 17:218-222

Powell D, PA Tyler & LS Peck. 2001. Effect of sperm concentration and sperm ageing on fertilization success in the Antarctic soft-shelled clam *Laternula elliptica* and

- the Antarctic limpet *Nacella concinna*. Marine Ecology Progress Series 215: 191-200
- Pusey A & M Wolf.** 1996. Inbreeding avoidance in animals. Trends in Ecology and Evolution 11: 201-206
- Queller DC & KF Goodnight.** 1989. Estimating relatedness using genetic markers. Evolution 43: 371-380
- Rex MA & A Warén.** 1982. Planktotrophic development in deep-sea prosobranch snails from the western North Atlantic. Deep Sea Research Part A. Oceanographic research Papers 29(2): 171-184
- Richard A.** 1971. Action qualitative de la lumiere dans le determinisme du cycle sexuel chez cephalopode *Sepia officinalis* Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles., Paris (Ser. D) 272:106-109
- Riginos C & Victor BC.** 2001. Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in eastern Pacific blennioid fishes. Proceeding Royal Society London B 268: 1931-1936
- Rivkin RB.** 1990. Seasonal patterns of planktonic production in McMurdo Sound Antarctica. American Zoologist 30:5-16

- Run JQ, CP Chen, KH Chang & FS Chia. 1988. Mating behavior and reproductive cycle of *Archaster typicus* (Echinodermata: Asteroidea). *Marine Biology* 99, 247–254.
- Schackleton NJ. 2000. The 100,000-year ice-age cycle identified and found to lag temperature, carbon dioxide, and orbital eccentricity. *Science* 289, 1897–1902
- Schatt P. 1985. Développement et croissance embryonnaire de l'oursin incubante *Abatus cordatus* (Echinoidea: Spatangoida). Thèse Doctorale, Université Pierre et Marie Curie, France.
- Schatt P & JP Féral. 1989. Influence de la profondeur sur le cycle de reproduction de l'oursin *Abatus cordatus*. Comparaison avec les autres espèces incubantes de la famille des Schizasteridae. *Vie Marine H.S* 10: 182
- Schatt P & JP Féral. 1991. The brooding cycle of *Abatus cordatus* (Echinodermata: Spatangoida) at Kerguelen Islands. *Polar Biology* 11:283-292
- Schatt P & JP Féral. 1996. Completely direct development of *Abatus cordatus*, a brooding Schizasterid (Echinodermata: Echinoidea) from Kerguelen, with description of Perigastrulation, a hypothetical new mode of gastrulation. *The Biological Bulletin* 190: 24-44

- Schinner GO & JB McClintock.** 1993. Structural characteristics of marsupial brood pouches of the Antarctic sea urchins *Abatus nimrodi* and *Abatus shackletoni* (Echinoidea: Spatangoida). *Journal of Morphology* 216, 79-93.
- Schoener A.** 1968. Evidence for reproductive periodicity in the deep sea. *Ecology* 49: 81–87.
- Sellem F & M Guillou.** 2007. Reproductive biology of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting habitats of northern Tunisia (southeast Mediterranean). Manuscript DOI : 10.1017/S002531540705521X
- Serrão EA, Havenhand J.**2009. Fertilization strategies. Chapter 10 En: "Marine Hard Bottom Communities. *Ecological Studies* 206". Wahl M (ed.), Springer Verlag. Berlin, Heidelberg
- Sewell MA.** 1992. Reproduction of the temperate aspidochirote *Stichopus mollis* (Echinodermata: Holothuroidea) in New Zealand. *Ophelia* 35 (2) 103-121
- Sewell MA & Chia FS.** 1994. Reproduction of the intraovarian brooding apodid *Leptosynapta clarki* (Echinodermata: Holothuroidea) in British Columbia. *Marine Biology* 121: 285–300.
- Sewell MA & Hofmann GE.** 2011. Antarctic echinoids and climate change: a major impact on the brooding forms. *Global Change Biology* 17: 734-744

- Schofield O, HW Ducklow, DG Martinson, MP Meredith, MA Moline & WR Fraser.** 2010. How do polar marine ecosystem respond to rapid climate change? *Science* 328: 1520-1523
- Shaw PW & WHH Sauer.** 2004. Multiple paternity and complex fertilization dynamics in the squid *Loligo vulgaris reynaudii*. *Marine Ecology Progress Series* 270: 173–179.
- Sheldon BC.** 1994. Male phenotype, fertility, and the pursuit of extra-pair copulations by female birds. *Proceedings the Royal Society Biological Sciences B* 257:25–30.
- Simmond JS.** 1982. Temperature and photoperiodic control of flower initiation in a New Guinea *Impatiens* hybrid. *Canadian Journal of Botany*. 60: 320-324.
- Simmons LW.** 2005. The evolution of polyandry: Sperm competition, sperm selection and offspring viability. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36:125-146
- Slate J, T Marshall & J Pemberton.** 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9: 801-808
- Slattery M & I Bosch.** 1993. Mating behavior of a brooding Antarctic asteroid, *Neosmilaster georgianus*. *Invertebrate Reproduction & Development* 24 (2): 97-102
- Smith CC & SD Fretwell.** 1974. Optimal balance between size and number of offspring. *American Naturalist* 108: 499–506

- Soucy S & J Travis.** 2003. Multiple paternity and population genetic structure in natural populations of the poeciliid fish, *Heterandria formosa*. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1328 – 1336
- Stanwell-Smith D, LS Peck, A Clarke, AWA Murray & CD Todd.** 1997. The Distribution, abundance and seasonality of pelagic marine invertebrate larvae in the maritime Antarctic. *Philosophical transaction of the Royal Society B* 354: 471-484
- Strathmann RR & MF Strathmann.** 1982. The relationship between adult size and brooding in marine invertebrates. *American Naturalist* 119:91-101
- Sumida, P. Y. G., Tyler, P. A., Lampitt, R. S., and Gage, J. D.** 2000. Reproduction, dispersal and settlement of the bathyal ophiuroid *Ophiocten gracilis* in the NE Atlantic Ocean. *Marine Biology* 137: 623–630.
- Taylor MS & ME Hellberg.** 2003. Genetic Evidence for Local Retention of Pelagic Larvae in a Caribbean Reef Fish. *Science* 299: 107-108
- Temkin MH.** 1994. Gamete spawning and fertilization in the gymnolaemate bryozoan *Membranipora membranacea*. *Biological Bulletin* 187:143–55
- Temkin MH.** 1996. Comparative fertilization biology of gymnolaemate bryozoans. *Marine Biology* 127:329–39

- Thorson G.** 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates. Meddr Kommm Danm Fisk-og Havunders (Ser Plankton) 4, 1–523.
- Thatje S, R Bacardit & W Arntz.** 2005a. Larvae of the Deep-Sea Nematocarinidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the Southern Ocean. *Polar Biology*, 28: 290–302.
- Thatje S, C Hillenbrand & R Larter.** 2005b. On the Origin of Antarctic Marine Benthic Community Structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 534–540.
- Thrush SE.** 1991. Spatial patterns in soft-bottom communities. *Trends in Ecology and Evolution* 3: 75-79
- Toonen RJ.** 2004. Genetic evidence of multiple paternity broods in the intertidal crab *Petrolishes cinctipes*. *Marine Ecology Progress Series* 270: 259-263
- Tregenza T & N Wedell.** 1998. Benefits of multiple mates in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Evolution* 52, 1726-1730
- Tregenza T & N Wedell.** 2002. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. *Nature* 415:71–73.
- Tréguer P & G Jacques.** 1992. Dynamics of nutrients and phytoplankton, and fluxes of carbon, nitrogen and silicon in the Antarctic Ocean. *Polar Biology*, 12: 149-162
- Tyler PA, SL Pain & JD Gage.** 1982a. Gametogenic cycles in deep-sea phanerozoan asteroids from the NE Atlantic. En: "Echinoderms: Proceedings of the

International Conference, Tampa Bay'' (J. Lawrence, ed.), pp. 431–434. A.A. Balkema, Rotterdam

Tyler PA, A Grant, SL Pain & JD Gage. 1982b. Is annual reproduction in deep-sea echinoderms a response to variability in their environment? *Nature* 300, 747–750.

Tyler PA & CM Young. 1992. Reproduction in marine invertebrates in "stable" environments: the deep sea model. *Invertebrate Reproduction & Development* 22 (1&3):185-192

Tyler PA, S Reeves, L Peck, A Clarke & D Powell. 2003. Seasonal variation in the gametogenic ecology of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Polar Biology* 26: 727–733

Van Oosterhout C, WF. Hutchinson, DPM Wills & P Shipley. 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538

Verheul MJ, Sønsteby A & Grimstad SO. 2006. Interactions of photoperiod, temperature, duration of short-day treatment and plant age on flowering of *Fragaria xananassa*. *Duch. Korona. Scientia Horticulturae* 107: 164–170

Vogler, D.W., and Kalisz, S. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55(1): 202-204

- Voight JR & KA Feldheim. 2009.** Microsatellite inheritance and multiple paternity in the deep sea octopus *Graneledone boreopacifica* (Mollusca: Cephalopoda). *Invertebrate Biology* 128(1): 26-30
- Walker D, AJ Power, M Sweeney-Reeves & JC Avise. 2007.** Multiple paternity and female sperm usage along egg-case string of the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca; Melongenidae). *Marine Biology* 151: 53–61
- Wang J. 2004.** Sibship Reconstruction From Genetic Data With Typing Errors. *Genetics* 166:1963-1979
- Wang J & AW Santure. 2009.** Parentage and sibship inference from multi-locus genotype data under polygamy. *Genetics* 181: 1579-1594
- Watson PJ. 1991.** Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphia litigiosa*. *Animal Behavior* 41:343–360.
- Webber HH & AC Giese. 1969.** Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda: Prosobranchiata). *Marine Biology* 4: 152-159
- Whitaker K. 2003.** Non-random mating and population genetic subdivision of two broadcasting corals at Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Biology* 144: 593–603.

- Wray GA & RA Raff. 1991.** The Evolution of Developmental Strategy in Marine Invertebrates. *Trends in ecology and evolution* 6(2): 45-50
- Yasui Y. 1998.** The “genetic benefit” of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 246-250
- Young CM., 1994.** A tale of two dogmas: The early history of deep-sea reproductive biology. En: “Reproduction, larval biology, and recruitment in the deep-sea benthos”. K.J., Young, C.M. Eckelbarger (Eds.), pp. 1–25. Columbia University Press, New York
- Young CM. 1999.** Synchrony and sociality: Breeding strategies in constant and variable environments. En “Aquatic Life Cycles Strategies: Survival in a Variable Environment”. M. Whitfield, J. Matthews and C. Reynolds, (eds.), pp. 1–14. Marine Biological Association of the United Kingdom, Plymouth
- Young CM. 2003.** Reproduction, development and life-history traits. En: “Ecosystems of the Deep Oceans. Vol. 28. Ecosystems of the World”. PA. Tyler, (ed.). Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- Yue GH & A Chang. 2010.** Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *Caridina ensifera*. *PLoS ONE* 5(9):e12721. Doi:10.1371/journal.pone.0012721

- Yue GH, JL Li, CM Wang, JH Xia, GL Wang & JB Fenh. 2010. High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, *Procambarus clarkia*. International Journal of Biological Sciences 6:107-115
- Yund PO & MA McCartney. 1994. Male reproductive success in sessile invertebrates: competition for fertilizations. Ecology 75:2151-216
- Yund PO. 1995. Gene flow via the dispersal of fertilizing sperm in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*): the effect of male density. Marine Biology 233: 649-654
- Yund, P.O. 1998. The effect of sperm competition on male gain curves in a colonial marine invertebrate. Ecology 79:328-339.
- Yund PO. 2000. How severe is sperm limitation in natural populations of marine free-spawners? Trends in Ecology and Evolution 15: 10-13
- Yund PO & PG O'Neil. 2000. Microgeographic genetic differentiation in a colonial ascidian (*Botryllus schlosseri*) population. Marine Biology 137: 583-588
- Zachos, J. M Pagani, L Sloan, E Thomas, K Billups. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. Science 292, 686-693

APÉNDICES

Tabla 1- Resumen de las condiciones de amplificación por PCR para los 6 loci de microsatélites seleccionados para individuos adultos y crías de *A. agassizii*.

Loci	Reactivo	Volumen (ul) por reacción	Programación PCR	Ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
2t & 18t	Taq poli.	0,5	Denaturación Inicial	1	3min	94
	Buffer	1,3	Denaturación	14	1min	94
	Dntp's	1,3	Alineamiento	14	30seg	60(Td)
	Primer F	0,5	Extensión	14	1min	72
	Primer R	0,5	Denaturación	16	1min	94
	MgCl ₂	2	Alineamiento	16	30seg	47
	BSA	0,5	Extensión	16	1min	72
	DNA	0,5	Denaturación	5	1min	94
	Agua miliQ	5,4	Alineamiento	5	30seg	55
			Extensión	5	1min	72
Elongación Final			1	5min	72	
44	Taq polim	0,5	Denaturación Inicial	1	3min	94
	Buffer	2,6				
	Dntp's	1,3	Denaturación	35	1min	94
	Primer	0,5	Alineamiento	35	30seg	51.5
	MgCl ₂	2	Extensión	35	1min	72
	BSA	0,8	Elongación Final	1	5min	72
	DNA	3				
	Agua miliQ	4,6				
41	Taq Pol	0,4	Denaturación Inicial	1	3min	94
	Buffer	2,6				
	dNTP's	1,3	Denaturación	35	1min	94
	Primers	0,5	Alineamiento	35	30seg	58,8
	MgCl ₂	1,3	Extensión	35	1min	72

	BSA	0,4	Elongación Final	1	5min	72
	DNA	2				
	Agua miliQ	6				
20t	Taq Pol	0,5	Denaturación Inicial	1	3min	94
	Buffer	2,5	Denaturación	35	1min	94
	dNTP's	1,3				
	Primers	0,5	Alineamiento	35	30seg	60,5
	MgCl ₂	1	Extensión	35	1min	72
	BSA	0,4				
	DNA	2	Elongación Final	1	5min	72
	Agua miliQ	6,3				
22t	Taq Pol	0,5	Denaturación Inicial	1	3min	94
	Buffer	2,6	Denaturación	35	1min	94
	dNTP's	1,3				
	Primers	0,5	Alineamiento	35	30seg	55,3
	MgCl ₂	1,5	Extensión	35	1min	72
	BSA	0,4				
	DNA	2	Elongación Final	1	5min	72
	Agua miliQ	5,7				

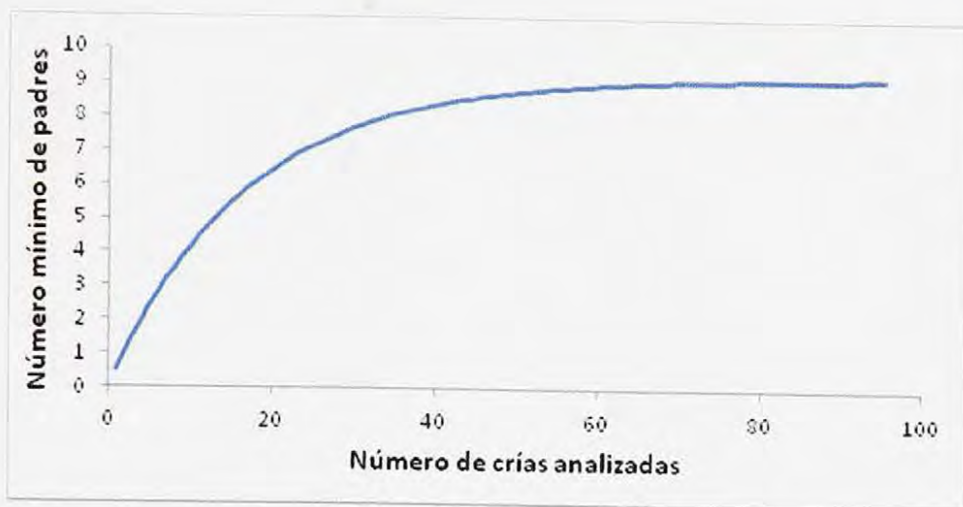


Fig. 1.- Gráfico de correlación exponencial entre número de crías evaluadas y número mínimo de machos que participan de la fecundación.